

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Zobrazovací metody v lékařství



MUDr. Kristýna Němejcová

HNF-1B a jeho význam u různých typů karcinomů a nenádorových lézí ženského genitálu na úrovni exprese proteinu, epigenetických a genetických změn

Significance of HNF-1B in different types of carcinomas and non-neoplastic lesions of the female genital system at the level of protein expression, epigenetic and genetic changes

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. MUDr. Pavel Dundr, PhD.

Praha, 2016

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu v biomedicině na Ústavu patologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v letech 2013-2015 s podporou grantového projektu IGA-MZ-ČR-NT/14001-3/2012 a PRVOUK P27/LF1.

Obor: Zobrazovací metody v lékařství

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jan Daneš, CSc.

Školící pracoviště: Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Studničkova 2, Praha 2, 128 00

Autor: MUDr. Kristýna Němejcová

Školitel: doc. MUDr. Pavel Dundr, PhD.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 19.01.2016

Kristýna NĚMEJCOVÁ

Podpis

Identifikační záznam:

NĚMEJCOVÁ, Kristýna. HNF-1B a jeho význam u různých typů karcinomů a nenádorových lézí ženského genitálu na úrovni exprese proteinu, epigenetických a genetických změn [Significance of HNF-1B in different types of carcinomas and non-neoplastic lesions of the female genital system at the level of protein expression, epigenetic and genetic changes]. Praha 2016. 108 stran, 19 příloh. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Školitel Dundr, Pavel

Seznam použitých zkratk

APA	atypický polypózní adenomyom
CEA	karcinoembryonální antigen
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
HNF-1 α	hepatocytární transkripční faktor 1 beta
HNF-1 β	hepatocytární transkripční faktor 1 beta
HNF1B	gen kódující hepatocytární transkripční faktor 1 beta
PCR	polymerázová řetězová reakce

OBSAH

1. Úvod	9
1.1. Exprese HNF v různých tkáních v průběhu vývoje a postnatálně	11
1.2. Exprese HNF-1 β v ženském genitálním systému	12
1.2.1. Exprese HNF-1 β v nádorech ovaria	12
1.2.2. Exprese HNF-1 β v nádorech děložního těla	13
1.2.3. Exprese HNF-1 β v nádorech děložního hrdla	15
1.2.4. Exprese HNF-1 β v nenádorových lézích ženského genitálu	15
2. Vymezení cílů práce	18
3. Materiál a metody	21
3.1. Tkáně	21
3.1.1. Nádorová tkáň	21
3.1.1.1. Karcinomy děložního hrdla	21
3.1.1.2. Karcinomy děložního těla	22
3.1.1.3. Karcinomy ovaria	22
3.1.2. Nenádorová tkáň	22
3.2. Imunohistochemická vyšetření	23
3.3. Cytogenetická analýza	26
3.3.1. Fluorescenční in situ hybridizace	26
3.4. Molekulárně biologická analýza	27
3.4.1. Izolace nukleových kyselin	27
3.4.2. PCR- polymerázová řetězová reakce	27
3.4.2.1 Analýza genů <i>KRAS</i> a <i>EGFR</i>	27
3.4.2.2. Analýza genu <i>NRAS</i>	28

3.4.2.3. Analýza genu <i>BRAF</i>	28
3.4.3. Molekulární analýza metylace promotoru a mutací genu <i>HNFI B</i>	28
4. Výsledky	31
4.1. Karcinomy děložního hrdla.....	31
4.1.1. Adenokarcinomy děložního hrdla.....	31
4.1.2. Dlaždicobuněčné karcinomy děložního hrdla	32
4.1.3. Nediferencované karcinomy děložního hrdla.....	32
4.2. Karcinomy děložního těla	33
4.2.1. Endometroidní karcinomy děložního těla	33
4.2.2. Serózní karcinomy děložního těla	33
4.2.3. Světlobuněčné karcinomy děložního těla.....	34
4.3. Světlobuněčné karcinomy ovaria.....	34
4.4. Nenádorové tkáně a léze hrdla a těla děložního	34
4.4.1 Nenádorová tkáň hrdla a čípku děložního.....	34
4.4.2 Nenádorové tkáně a léze těla děložního.....	35
4.5. Molekulární analýza metylace promotoru a mutací genu <i>HNFI B</i>	35
4.5.1. Epigenetická analýza	35
4.5.2. Mutační analýza.....	36
4.6. Atypické polypózní adenomyomy	37
4.6.1. Imunohistochemická analýza atypických polypózních adenomyomů.....	37
4.6.2. Molekulární analýza atypických polypózních adenomyomů	38
4.6.2.1. Analýza atypických polypózních adenomyomů metodou FISH	38
4.6.2.2. Analýza atypických polypózních adenomyomů metodou PCR	39
5. Diskuse	40
6. Závěr	53

7. Summary	57
8. Literatura	61
9. Přílohy	71
Tabulka 1. Páry primerů pro metylační a mutační analýzy genu <i>HNF1B</i>	71
Tabulka 2. Imunohistochemický nálezn v karcinomech děložního čípku.	72
Tabulka 3. Přehled protilátek, které by mohly být využitelné v diferenciální diagnostice adenokarcinomů a dlaždicobuněčných karcinomů děložního čípku.	73
Tabulka 4. Shrnutí výsledku imunohistochemických vyšetření v karcinomech a lézích endometria a světlbuněčném karcinomu ovaria.	74
Tabulka 5. Imunohistochemické výsledky atypických polypózních adenomyomů.	75
Tabulka 6. Molekulární výsledky atypických polypózních adenomyomů.	76
Obrázek 1. Silná jaderná exprese HNF-1 β v adenokarcinomu děložního čípku.	77
Obrázek 2. Středně silná exprese HNF-1 β v adenokarcinomu děložního čípku.	78
Obrázek 3. Slabá exprese HNF-1 β v adenokarcinomu děložního čípku.	79
Obrázek 4. Silná exprese HNF-1 β v dlaždicobuněčném karcinomu děložního čípku.	80
Obrázek 5. Fokální exprese HNF-1 β v dlaždicobuněčném karcinomu děložního čípku.	81
Obrázek 6. Expres HNF-1 β v nediferencovaném karcinomu děložního čípku.	82
Obrázek 7. Expres HNF-1 β v lézích a nádorech endometria.	83
Obrázek 8. Bisulfitový sekvenační elektroforeogram a nově nalezená frame-shift mutace genu <i>HNF1B</i>	84
Obrázek 9. Atypický polypózní adenomyom- makrofoto.	85
Obrázek 10. Atypický polypózní adenomyom – mikrofoto, histologické znaky.	86
Publikace s IF	
Němejcová, K., Cibula, D., Dundr, P.: Expression of HNF-1 β in cervical carcinomas: an immunohistochemical study of 155 cases. Diagn Pathol. 2015 Mar 25;10:8.	88

Němejcová, K., Kenny, SL., Laco, J., Škapa, P., Staněk, L., Zikán, M., Kleiblová, P., McCluggage, WG., Dundr, P.: Atypical Polypoid Adenomyoma of the Uterus: An Immunohistochemical and Molecular Study of 21 Cases. Am J Surg Pathol. 2015, 39(8):1148-55.....	95
Němejcová, K., Tichá, I., Kleiblová, P., Bártů, M., Cibula, D., Dundr, P.: Expression, epigenetic and genetic changes of HNF1B in endometrial lesions. Pathol Oncol Res. 2015, In Press.....	101

1. ÚVOD

Hepatocytární jaderný faktor 1 beta (HNF-1 β) je transkripční faktor patřící do rodiny hepatocytárního transkripčního faktoru 1 (HNF-1), která zahrnuje HNF-1 (HNF-1 α , Tcf-1) a variantní izoformu vHNF-1 (HNF-1 β , Tcf-2, LFB3). HNF-1 β a HNF-1 α spolu sdílí vysoký stupeň homologie v místech důležitých pro vazbu DNA a fungují jako homodimery nebo heterodimery (De Simone V. et al., 1991). Proteiny z rodiny hepatocytárního transkripčního faktoru přímými či nepřímými mechanismy regulují expresi četných genů podílejících se na modulaci buněčného cyklu, hrají klíčovou roli při ontogenezi, indukují apoptózu a uplatňují se v karcinogenezi některých typů nádorů (Tsuchiya A. et al., 2003; Cereghini S. et al., 1992; Pontoglio M., 2000; Kim L. et al., 2008; Buchner A. et al., 2010). HNF-1 β a HNF-1 α jsou také považovány za regulátory glukózového metabolismu, podílí se na vzniku časného nástupu diabetu mellitu a ovlivňují pravděpodobně i apoptózu (Pontoglio M., 2000; Suzuki E. et al., 2015).

Hepatocytární transkripční faktory jsou kódovány genem *HNF-1B* ležícím na dlouhém raménku chromozomu 17q12 (tvořeném devíti kódujícími exony v rozsahu přibližně 60 kb), který kóduje čtyři proteinové isoformy, nazývané A, B, C a 4 (Bach I. et Yaniv M., 1993; Horikawa Y. et al., 1997). Nejdelší isoforma A je tvořena 557 aminokyselinami (aa) a obsahuje dimerizační doménu aa 231-311 (UniProt P35680; <http://www.uniprot.org>). U isoformy B (oproti isoformě A) chybí aa 183-208. Isoforma C se od isoformy A liší strukturou aa 350-40 a absencí aa 401-557 na terminálním C konci proteinu (Bach I. et Yaniv M., 1993; Horikawa Y. et al., 1997). Isoformy A a B jsou považovány za transkripční aktivátory, zatímco isoforma C je nejspíše transkripčním represorem (Bach I. et Yaniv M., 1993). *HNF1B* se tedy zřejmě v různých typech nádorů může chovat jako tumor supresorový

gen anebo jako onkogen. V jedné recentní studii byl *HNF1B* dokonce identifikován jako hlavní onkogen nutný k přežívání nádorových buněk (Shao D. et al., 2013).

Hereditární mutace genu *HNF1B* jsou spojeny s některými poruchami vývoje ledvin a se syndromem renálních cyst a diabetu (RCAD), pro který jsou charakteristické mnohotné abnormality ledvin, ženského i mužského pohlavního ústrojí, hypoplazie pankreatu a poruchy jater (Bellanné-Chantelot C. et al., 2004; Lokmane L. et al., 2008).

Epigenetické změny a mutace genu *HNF1B* se také podílejí na vzniku některých nádorů, známé jsou například germinální mutace prokázané u chromofóbního karcinomu ledvin (Rebouissou S. et al., 2005). Na imunohistochemické úrovni se tyto změny nebo mutace mohou projevit ztrátou nebo naopak zvýšenou expresí proteinu HNF-1 β (Kato N. et al., 2008; Kim L. et al., 2008; Buchner A. et al., 2010). Epigenetická inaktivace genu (metylace) obvykle vede ke ztrátě exprese HNF-1 β (Tsuchiya A. et al., 2003). Metylace *HNF1B* byla nalezena u některých buněčných linií karcinomu pankreatu, kolorekta, žaludku a ovaria (Terasawa K. et al., 2006; Rebouissou S. et al., 2005). V dalších typech nádorů je naopak HNF-1 β upregulován a zvýšená exprese tohoto proteinu byla nalezena např. ve většině světlobuněčných karcinomů pankreatu, ovaria, ledviny a v hepatocelulárním karcinomu (Kato N. et al., 2006; Kato N. et al., 2008; Tsuchiya A. et al., 2003; Wang W. et al., 1998; Yamamoto S. et al., 2007). Některé práce uvádějí, že snížená exprese HNF-1 β ve světlobuněčných karcinomech ledvin a prostaty, u kterých je tento protein obvykle exprimován ve vyšší míře, je spojená s progresí nádoru a zároveň s horší prognózou (Terasawa K. et al. 2006; Hu YL. et al., 2013). Mutace genu *HNF1B* také ovlivňuje expresi downstream genů jako je *HNF4 α* , *PKHD1*, osteopontin, dipeptidyl peptidáza IV (DPP-IV), collectrin a angiotenzin konvertující enzym 2 (ACE2) (Rebouissou S. et al., 2005; Kato N. et al., 2009). Nicméně přesná role HNF-1 β v karcinogenezi a tedy i možný význam terapeutického ovlivnění tohoto proteinu zůstávají dosud neobjasněny.

Analýzou epigenetických změn *HNF1B* v nádorech ženského genitálu se zabývalo pouze několik studií (Shen H. et al., 2013; Terasawa K. et al., 2006). S ohledem na genetické změny, dosud bylo popsáno pouze šest somatických genetických variant (2 silent, 3 missense and 1 frameshift) v rámci velké studie „Uterine Corpus Endometrioid Carcinoma (TCGA, US), jejíž součástí byla analýza 514 endometroidních karcinomů importovaných z ICGC“ (Cosmic database; accessed October 2015; <http://www.sanger.ac.uk/cosmic>).

1.1. Exprese HNF v různých tkáních v průběhu vývoje a postnatálně

Proteiny z rodiny hepatocytárního transkripčního faktoru HNF-1 β a HNF-1 α hrají důležitou roli během vývoje a jsou s určitými časovými a prostorovými rozdíly exprimovány v endodermu žloutkového váčku a během vývoje v buňkách endodermálního a mesodermálního původu, v ledvinách, játrech a pankreatu (Cereghini S. et al., 1992). HNF-1 β je také exprimován během vývoje v neurální trubici, v plicích a urogenitální soustavě (De Simone V. et al., 1991; Haumaitre C. et al., 2003; Lazzaro D. et al., 1992). Oba tyto faktory mají zásadní význam pro různá stadia ontogeneze savčích embryí. HNF-1 β je exprimován již v prvních stádiích organogeneze, kdy hraje klíčovou roli při diferenciaci viscerálního endodermu z primitivního endodermu a je nezbytný pro tvorbu renálních tubulů, intrahepatálních žlučovodů, žlučníku a základu pankreatu (Barbacci E. et al., 2004; Cereghini S., 1996). K expresi HNF-1 α dochází až později a tento faktor je také přítomen v menším množství než HNF-1 β . Po narození však HNF-1 α převládá ve všech orgánech kromě ledvin. Oproti HNF-1 β není exprese HNF-1 α nezbytná pro normální embryonální vývoj, hraje však důležitou roli při postnatálním vývoji jater, ledvin a pankreatu (De Simone V. et al., 1991; Haumaitre C. et al., 2003; Lazzaro D. et al., 1992).

Ačkoli má HNF-1 β v názvu adjektivum hepatocytární, je tento faktor v jaterní tkáni exprimován jen velmi slabě, zatímco HNF-1 α zde tvoří více než 95 % celkového množství HNF-1 proteinů (Blumenfeld M et al., 1991). V ostatních tkáních se kromě období organogeneze exprese obou těchto faktorů do jisté míry překrývá a byla prokázána v epitelových buňkách urogenitální soustavy, v játrech, v pankreatu, ve střevech a v plicích (De Simone V. et al., 1991; Haumaitre C. et al., 2003; Lazzaro D. et al., 1992). V ledvinách je HNF-1 β silněji exprimován v distálních a sběracích kanálcích nežli v Henleově kličce a proximálních kanálcích (Ott MO. et al., 1991; Pontoglio M. et al., 1996). V derivátech mesonefrických vývodů, jako jsou vývodné kanálky ledvin nebo kanálky nadvarlete, je HNF-1 β exprimován převážně během dětství, ale vzácně jej můžeme prokázat i v dospělosti (Kato N. et Motoyama T., 2009).

1.2. Exprese HNF-1 β v ženském genitálním systému

V oblasti nádorů ženského genitálu byla exprese HNF-1 β dosud analyzována pouze v několika studiích, které se zabývaly zejména světlobuněčnými karcinomy ovaria a recentně byla popsána i u některých dalších typů nádorů děložního těla a hrdla. Z nenádorových tkání byla exprese tohoto proteinu analyzována pouze v normálním endometriu v různých fázích menstruačního cyklu, ve tkáních ovaria a v endometrióze.

1.2.1. Exprese HNF-1 β v nádorech ovaria

Při analýze ovariálních nádorů byla ve většině studií prokázána exprese HNF-1 β převážně jen ve světlobuněčných karcinomech. Světlobuněčné karcinomy ovaria patří mezi nádory se špatnou prognózou, které jsou rezistentní ke standardní chemoterapii založené na platině a jejich přesná diagnostika má zásadní význam s ohledem na další terapii (Goff BA. et

al., 1996). Z výsledků studií zabývajících se problematikou odlišení tohoto typu karcinomu od ostatních high grade karcinomů ovaria vyplývá, že HNF-1 β je vysoce senzitivní a specifický marker pro tento typ karcinomu (Kato N. et al., 2006; Kato N. et al., 2008; Tsuchiya A. et al., 2003; Yamamoto S. et al., 2007). Navíc bylo prokázáno, že snížení exprese HNF-1 β v buněčných liniích světlobuněčného karcinomu ovaria indukuje apoptózu a exprese tohoto transkripčního faktoru se tedy zdá být v některých případech významnou pro přežívání nádorových buněk (Tsuchiya A. et al., 2003). Přesné mechanismy jak a proč k tomu dochází, však nebyly dosud jednoznačně vysvětleny a jsou předmětem dalších výzkumů. Závěry některých studií naznačují, že HNF-1 β by se mohl stát novým terapeutickým cílem při terapii světlobuněčných karcinomů ovaria.

Nicméně v několika recentnějších pracech byla popsána exprese HNF-1 β i v jiných typech nádorů ovaria včetně karcinomů endometroidních, vzácněji i u mucinózních a serózních, a také ve většině borderline nádorů ovaria (Huang W. et al., 2016; Fadare O. et al., 2012; Liang SX., 2012; Kalloger SE. et al., 2011; Park KJ. et al., 2011, Tomassetti A. et al., 2008). S ohledem na tato data bude nutné expresi HNF-1 β a její význam u nádorů ovaria podrobněji analyzovat.

1.2.2. Exprese HNF-1 β v nádorech děložního těla

Z nádorů děložního těla byla exprese HNF-1 β dosud analyzována pouze v karcinomech endometria. Karcinomy endometria dělíme na základě kombinace architektonických a cytologických znaků na endometriodní, mucinózní, světlobuněčné, serózní, neuroendokrinní, smíšené a nediferencované/dediferencované. V některých případech je však jednoznačné určení histotypu nádoru pouze na základě morfologie obtížné. Zejména obtížná je diferenciální diagnostika mezi světlobuněčnými karcinomy endometria a jinými typy karcinomů, které vykazují světlobuněčnou přeměnu. Rozlišení mezi těmito skupinami

nádorů je důležité zejména proto, že světlobuněčné karcinomy jsou spolu se serózními a grade 3 endometroidními považovány za high grade tumory (typ II) s odlišnou prognózou, rekurencí a odpovědí na konvenční chemoterapii, nežli low grade karcinomy endometria (typ I) zahrnující endometroidní karcinom (grade 1, grade 2) a dobře diferencovaný mucinózní karcinom (Goff BA. et al., 1996).

Vzhledem k výsledkům studií exprese HNF-1 β v ovariálních světlobuněčných karcinomech, kde se HNF-1 β ukázal jako vysoce specifický a senzitivní marker, se několik dalších prací se věnovalo analýze exprese tohoto proteinu v nádorech endometria, se zaměřením světlobuněčné karcinomy endometria a jejich přepokládané prekursorové léze. Výchozím předpokladem těchto analýz byl obecný princip, že histotypy karcinomů vyrůstající z různých anatomických derivátů Müllerových vývodů vykazují obdobné histologické znaky bez ohledu na jejich lokalizaci. Nicméně je nutné zdůraznit, že tento obecný předpoklad by mohl zastřít málo patrné rozdíly, které jsou spojené s různou lokalitou nádorů, a znesnadnit tak definování skutečného fenotypického spektra histotypů nádorů v různých konkrétních lokalitách. Kupříkladu serózní karcinomy jsou typickým příkladem histotypu, kde byly prokázány rozdíly v souvislosti s různou lokalizací nádoru. Mezi serózními karcinomy vzniklými v ovariu a serózními karcinomy vzniklými v endometriu jsou odlišnosti jak v morfologickém spektru tak v imunofenotypickém profilu (Bárcena C. et Oliva E., 2011).

Ve studiích zabývajících se expresí HNF-1 β ve světlobuněčných karcinomech endometria nebyla na rozdíl od světlobuněčných karcinomů ovaria prokázána tak vysoká specificita, ačkoli senzitivita tohoto markeru je u nádorů v této lokalitě poměrně vysoká (Fadare O. et Liang SX., 2012). Stejně jako ovariální světlobuněčné karcinomy jsou i světlobuněčné karcinomy endometria asociovány s horší prognózou a jejich přesná diagnostika má zásadní význam. Nicméně, na základě výsledků recentnějších studií se zdá, že exprese HNF1 β má při diferenciální diagnostice karcinomů endometria na

imunohistochemické úrovni spíše pouze pomocný význam (Park KJ. et al., 2011; Kenny SL. et al., 2012). Různý rozsah a charakter exprese HNF-1 β totiž vykazují podle některých prací také některé serózní karcinomy endometria a v menší míře i endometriodní karcinomy (Fadare O. et Liang SX., 2012).

1.2.3. Exprese HNF-1 β v nádorech děložního hrdla

U karcinomů děložního hrdla byla dosud exprese HNF-1 β zmíněna pouze ve dvou studiích. Jedna byla primárně zaměřena na stav HPV a imunohistochemický profil neobvyklých histologických subtypů nádorů. Autoři zde prokázali expresi HNF-1 β zejména ve světlobuněčných karcinomech, v několika dalších případech méně obvyklých subtypů adenokarcinomu a v jednom karcinosarkomu děložního hrdla (Park KJ. et al., 2011). Druhá práce se zabývala imunohistochemickou analýzou sedmi mesonefrických adenokarcinomů děložního hrdla, u kterých byla ve třech případech nalezena pozitivita HNF-1 β (Kenny SL. et al., 2012).

Nicméně systematická analýza exprese HNF-1 β v karcinomech děložního hrdla na větším souboru případů, který by zahrnoval i jiné typy nádorů než adenokarcinomy, nebyla dosud v literatuře popsána.

1.2.4. Exprese HNF-1 β v nenádorových lézích ženského genitálu

Výsledky studií, které se zabývají se problematikou exprese HNF-1 β v normálních tkáních a nenádorových lézích nejsou zcela jednoznačné. Někteří autoři uvádějí expresi tohoto proteinu jednak v derivátech Mülleriánského traktu, dále v nenádorovém endometriu, a to téměř výlučně v sekreční fázi menstruačního cyklu nebo při graviditě, kde v obou případech cytoplazma obsahuje určité množství glykogenu (Yamamoto S. et al., 2007). Tyto

nálezy naznačují, že exprese HNF-1 β by mohla být regulována pohlavními steroidními hormony či choriovým gonadotropinem.

V normální tkáni ovaria není exprese HNF-1 β podle některých studií přítomna (Kato N. et al., 2006; Fadare O. et Liang SX., 2012). Nicméně jedna ze studií popsala expresi HNF-1 β v ovariálních inkluzních cystách (Tomassetti A. et al., 2008).

Další práce popisují expresi HNF-1 β i v některých případech endometriózy, zejména v endometrióze atypické nebo se zánětlivými změnami, která je považována za předpokládaný prekursor světlobuněčných karcinomů ovaria, pro něž je HNF-1 β vysoce specifickým a podle řady prací i senzitivním markerem (Kato N. et Motoyama T., 2009).

Kromě toho byla pozitivita HNF-1 β v ženském genitálu zastižena i v embryonálních reziduích mesonefrických vývodů ležících v mesovariu nebo v mesosalpinx. (Kato N. et Motoyama T., 2009). Podle jiné práce však v mesonefrických žlázkách v endocervixu exprese tohoto proteinu prokázána nebyla (Kenny SL. et al., 2012).

Z uvedeného přehledu vyplývá, že problematika exprese HNF-1 β v ženském genitálu dosud nebyla dostatečně prozkoumána, neboť výsledky novějších studií naznačují, že exprese HNF-1 β , která byla donedávna považovaná za vysoce senzitivní a specifický marker ovariálních světlobuněčných karcinomů, byla recentně popsána i v jiných typech karcinomů ženského genitálu. Na druhé straně v některých nádorech ženského genitálu, jako např. v karcinomech děložního hrdla, byla tato exprese zkoumána pouze zcela okrajově, a v některých subtypech, např. v dlaždicobuněčných karcinomech děložního hrdla, nebyla zatím analyzována vůbec. Analýzou epigenetických změn a mutací genu *HNF1B* v nádorech ženského genitálu se dosud zabývalo pouze několik studií. Ani výsledky studií zabývajících se problematikou exprese HNF-1 β v normálních tkáních a nenádorových lézích nejsou zcela jednoznačné. Přesná role genu *HNF1B* v karcinogenezi i možný význam terapeutického

ovlivnění proteinu HNF-1 β zůstávají v současné době neznámé. Považovali jsme proto za užitečné zaměřit svoji pozornost na určité oblasti týkající se této problematiky, kterým dosud zatím nikdo nevěnoval pozornost, nebo ve kterých přetrvávají nejasnosti z hlediska exprese proteinu HNF-1 β .

2. VYMEZENÍ CÍLŮ PRÁCE

Práce je zaměřena na komplexní analýzu HNF1B v normální tkáni, různých typech nádorů a nenádorových lézích ženského genitálu na úrovni imunohistochemické a molekulárně biologické. Soustřeďuje se na zhodnocení možného přínosu imunohistochemické analýzy tohoto proteinu pro diferenciální diagnostiku jednotlivých histologických typů nádorů. Zaměřuje se na korelaci exprese HNF1- β s expresí dalších markerů využívaných v diferenciální diagnostice nádorů ženského genitálu s možným diagnostickým, prognostickým a prediktivním významem. Zabývá se hodnocením exprese HNF-1 β v normální tkáni a některých nenádorových lézích ženského genitálu a analyzuje epigenetické a genetické změny genu *HNF1B* v lézích endometria a světlobuněčných karcinomech ovaria. Další studovanou problematikou je imunohistochemická analýza exprese proteinu HNF-1 β a dalších proteinů na skupině atypických polypózních adenomyomů. Cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Analýza exprese HNF-1 β v různých typech invazivních karcinomů děložního hrdla a zhodnocení možného přínosu imunohistochemické analýzy exprese tohoto proteinu pro diferenciální diagnostiku jednotlivých histologických typů nádorů, zejména níže diferencovaných karcinomů.
2. Porovnání nálezu exprese tohoto proteinu s dalšími imunohistochemickými markery využívanými v diferenciální diagnostice diagnosticky obtížných lézí děložního hrdla.
3. Komplexní analýza exprese HNF-1 β v různých typech karcinomů děložního těla a zhodnocení možného přínosu imunohistochemické analýzy exprese tohoto proteinu

pro diferenciální diagnostiku jednotlivých histologických typů nádorů, zejména světlobuněčných karcinomů.

4. Hodnocení exprese HNF-1 β v nenádorových lézích ženského genitálu, zejména v korporálním endometriu v různých fázích menstruačního cyklu, v prekancerózních lézích, v povrchovém epitelu čípku a endocervikálních žlázkách.
5. Analýza epigenetických a genetických změn genu *HNF1B* v lézích endometria a světlobuněčných karcinomech ovaria.
6. Imunohistochemická analýza exprese HNF-1 β a dalších proteinů na skupině atypických polypózních adenomyomů (APA), vzácných rekurujících lézí děložního těla. Dále analýza molekulárních alterací těchto lézí.

Výsledky naší práce týkající se vymezených cílů byly publikovány v následujících článcích:

publikace s IF

1. Němejcová, K., Kenny, SL., Laco, J., Škapa, P., Staněk, L., Zikán, M., Kleiblová, P., McCluggage, WG., Dundr, P.: Atypical Polypoid Adenomyoma of the Uterus: An Immunohistochemical and Molecular Study of 21 Cases. *Am J Surg Pathol.* 2015; 38:1148-55.
2. Němejcová, K., Cibula, D., Dundr, P.: Expression of HNF-1 β in cervical carcinomas: an immunohistochemical study of 155 cases. *Diagn Pathol.* 2015 Mar 25;10:8.

3. Němejcová, K., Tichá, I., Kleiblová, P., Bártů, M., Cibula, D., Dundr, P.: Expression, epigenetic and genetic changes of HNF1B in endometrial lesions. *Pathol Oncol Res.* 2015, In Press

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Tkáně

Vyšetřované tkáně byly většinou získány během diagnostického nebo terapeutického chirurgického zákroku, a jednalo se o vzorky, které jsme rutinně biopsicky vyšetřovali na našem pracovišti. Dále nám bylo pro účely studie zapůjčeno 12 tkáňových bločků se vzorky atypických polypózních adenomyomů (2 vzorky z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK FN Motol, Praha; 2 vzorky z Fingerlandova ústavu patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové; 8 vzorků z Department of Pathology, Royal Group of Hospitals Trust, Belfast, Severní Irsko, Spojené království). Pro molekulární analýzu bylo dále využito 18 zmrazených tkáňových vzorků endometroidních karcinomů děložního těla deponovaných v Bance biologického materiálu (BBM) na našem pracovišti.

Celkem šlo o 574 vzorků od 570 pacientek zahrnujících 77 kyretáží, 8 punch biopsií, 5 polypektomií, 19 konizátů, 465 hysterektomií (z toho bylo 389 hysterektomií s adexektomií).

3.1.1. Nádorová tkáň

Celkem jsme vyšetřili 399 vzorků karcinomů ženského genitálu, které zahrnovaly karcinomy děložního hrdla, děložního těla a karcinomy ovaria.

3.1.1.1. Karcinomy děložního hrdla

Celkem jsme analyzovali 155 karcinomů děložního hrdla. Tyto karcinomy tvořilo:

1) 56 případů adenokarcinomu děložního hrdla (pacientky ve věku 31-88 let). Tyto případy zahrnovaly 46 endocervikálních adenokarcinomů běžného typu, 8 mucinózních karcinomů nespecifického typu a 2 mucinózní karcinomy intestinálního typu. S ohledem na grading byly 4 karcinomy dobře diferencované, 37 středně diferencovaných a 15 nízcě diferencovaných.

2) 85 případů dlaždicobuněčného karcinomu děložního hrdla (pacientky ve věku 26-71 let). Z toho byly 2 karcinomy dobře diferencované, 49 středně diferencovaných a 34 níže diferencovaných.

3) 14 případů nediferencovaných karcinomů děložního hrdla (pacientky ve věku 26-71 let).

3.1.1.2. Karcinomy děložního těla

Celkem jsme analyzovali 225 karcinomů děložního těla. Z tohoto množství bylo:

1) 180 případů endometroidního karcinomu děložního těla (pacientky ve věku 27-90 let). S ohledem na grading bylo 77 karcinomů bylo dobře diferencovaných, 73 středně diferencovaných, 30 níže diferencovaných.

2) 27 případů serózního karcinomu děložního těla (pacientky ve věku 53-80 let).

3) 18 případů světlobuněčného karcinomu děložního těla (pacientky ve věku 48-73 let).

U všech případů byla provedena imunohistochemická analýza, u 33 případů byla kromě toho provedena analýza zaměřená na výskyt epigenetických a genetických změn genu *HNF1B*.

3.1.1.3. Karcinomy ovaria

Celkem jsme analyzovali 19 případů světlobuněčných karcinomů ovaria (19 pacientek ve věku 47-78 let). U všech těchto vzorků byla zároveň prováděna analýza epigenetických a genetických změn genu *HNF1B*.

3.1.2. Nenádorová tkáň

Celkem jsme vyšetřili 175 vzorků zahrnujících normální tkáň a léze ženského genitálu (171 pacientek ve věku 21-88 let). Z tohoto množství bylo:

1) 59 vzorků děložního hrdla a čípku.

- 2) 18 vzorků proliferativního endometria.
- 3) 15 vzorků vzorků sekrečního endometria.
- 4) 5 vzorků atrofického endometria.
- 5) 16 vzorků korporálního polypu, s hyperplazií bez atypií.
- 6) 14 vzorků korporálního polypu, s atypickou hyperplazií.
- 7) 11 vzorků hyperplastického endometria, bez atypií.
- 8) 16 vzorků korporálního endometria s atypickou hyperplazií.
- 9) 21 vzorků APA od 17 pacientek. Vzhledem k tomu, že jde o poměrně vzácně se vyskytující lézi, bylo kromě vzorků biopsicky vyšetřených na našem pracovišti v rutinním provozu analyzováno dalších 12 vzorků zapůjčených z jiných výše uvedených pracovišť. Vzorky zahrnovaly 6 případů s rekurentními/perzistujícími lézemi po předchozí polypektomii či kyretáži, nicméně pouze u 4 z těchto případů byl dostupný materiál z primární i rekurující/persistentní léze vhodný k analýze (17 pacientek ve věku 29-53 let).

Zpracování tkáně

Všechny vzorky byly nejprve fixovány v 10% formolu a poté zality do parafínu.

3.2. Imunohistochemická vyšetření

Imunohistochemická vyšetření byla provedena na řezech silných 3-4 μm . Použili jsme standardní avidin-biotin peroxidázovou metodu, jako chromogen byl použit diaminobenzidin, jako enzym peroxidáza.

Všechny vzorky byly vyšetřeny s protilátkou proti HNF-1 β (polyklonální, 1:500; Sigma-Aldrich, Prestige antibodies, St Louis, United States). Teplem indukované odhalení antigenů bylo provedeno v 0.01M citrátovém pufru (pH 6,1). Kromě této protilátky byla v jednotlivých analyzovaných skupinách provedena i vyšetření s dalšími protilátkami:

1) Případy ze skupiny karcinomů děložního hrdla, včetně nenádorového epitelu hrdla a čípku, a kontrolní skupina 19 světlobuněčných karcinomů ovaria byly vyšetřeny s protilátkami proti estrogenovým receptorům (monoklonální, klon GF11, 1:50, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom), progesteronovým receptorům (monoklonální, klon 16, 1:200, Novocastra), CEA (monoklonální, klon II-7, 1:100, Dako, Glostrup Denmark), p63 (monoklonální, klon 4A4, 1:50, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA), p40 (polyklonální, 1:50, BioSystems), p16 (monoklonální, klon E6H4, CINtec® Histology Kit, Roche mtm Laboratories AG, Mannheim, Germany) a D2-40 (monoklonální, klon D2-40, 1:100, Dako). Odkrytí antigenů bylo pro progesteronové receptory a CEA provedeno v 0.01 M citrátovém pufru (pH 6,0) ve vodní lázni při teplotě 98°C a teplem indukované odhalení antigenů pro estrogenové receptory, p63 a p40 v 0.01M citrátovém pufru (pH 9,0). Všechny vzorky byly zpracovány manuálně kromě p16, která byla zpracována v automatu Ventana Benchmark.

Výsledky byly semikvantitativně hodnoceny na čtyřstupňové škále dle procenta positivity nádorových buněk: 0 = <5 %; 1+ = 5-29 %; 2+ = 30-59 %; 3+ = >60 % pozitivních nádorových buněk. Pro HNF-1 β , estrogenové receptory, progesteronové receptory, p63 a p40 byla hodnocena pouze jaderná pozitivita a pro p16 jaderná a cytoplasmatická pozitivita. U CEA a D2-40 jsme posuzovali pouze membránovou pozitivitu. Intenzitu barvení HNF-1 β jsme hodnotili jako slabou, středně silnou a silnou.

2) Karcinomy děložního těla byly vyšetřeny s protilátkou HNF-1 β a stejně jako karcinomy děložního hrdla semikvantitativně hodnoceny na čtyřstupňové škále dle procenta jaderné positivity nádorových buněk: 0 = <5 %; 1 = 5-29 %; 2 = 30-59 %; 3 = >60 %. Intenzita barvení HNF-1 β byla stejně jako u lézí děložního hrdla hodnocena jako slabá, středně silná nebo silná.

3) Vzorky nenádorové tkáně děložního těla byly vyšetřeny s protilátkou HNF-1 β a stejně jako karcinomy děložního hrdla a těla semikvantitativně hodnoceny na čtyřstupňové škále dle procenta jaderné positivity nádorových buněk: 0 = ≤ 5 %; 1 = 5-29 %; 2 = 30-59 %; 3 = > 60 % pozitivních nádorových buněk, s intenzitou barvení posuzovanou jako slabou, středně silnou nebo silnou.

4) APA byly kromě HNF-1 β dále analyzovány s protilátkami proti β -kateninu (monoklonální, klon β -catenin-1, 1:400; Dako, Glostrup, Denmark), mTOR (fosforylovaný, monoklonální, klon 7C10, 1:50; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA), p53 (monoklonální, klon DO7, 1:50; Immunotech, QC, Canada), PTEN (monoklonální, klon SP218, 1:200; Spring Bioscience, Pleasanton, CA), GLUT1 (polyklonální, 1:100; Cell Marque, Rocklin, CA), MLH-1 (monoklonální, klon G168-15, 1:50; Zytomed Systems, Berlin, Germany), MSH-2 (monoklonální, klon FE 11, 1:50, Zytomed Systems), MSH-6 (monoklonální, klon FE 11, 1:50; Zytomed Systems) a PMS-2 (monoklonální, klon EPR3947, ready-to-use; Zytomed Systems). Odhalení antigenů bylo pro protilátky β -katenin, mTOR, p53, PTEN, MSH-1 a MSH-6 provedeno v 0.01M citrátovém pufru (pH 6,0) ve vodní lázni při teplotě 98°C. Pro protilátky GLUT1, PMS-2 a MLH-1 bylo teplem indukované odhalení antigenů provedeno v 0.01M citrátovém pufru (pH 9,0).

Expres HNF-1 β , β -kateninu, PTEN, mTOR a GLUT1 byla semikvantitativně hodnocena na pětistupňové škále dle procentuální positivity nádorových buněk: 0 = ≤ 5 %; 1+ = 5-10 %; 2+ = 11-50 %; 3+ = 51-75 %; a 4+ = > 75 %. Expres HNF-1 β , β -kateninu a GLUT1 v atypických polypózních adenomymomech byla pro žlázovou a skvamózní/morulární komponentu léze hodnocena odděleně. Intenzita barvení HNF-1 β byla hodnocena jako slabá, středně silná nebo silná. Proteiny mikrosatelární instability MLH-1,

MSH-2, MSH-6 a PMS-2 byly hodnoceny jako negativní, pokud nebyla prokázána žádná jaderná pozitivita, nebo jako pozitivní, při přesvědčivé jaderné pozitivitě epitelových buněk bez ohledu na její rozsah. Expres p53 byla hodnocena jako „divoký typ“ nebo „mutovaný typ“. Za „mutovaný typ“ exprese byla považována difúzní silně intenzivní jaderná exprese více než 75 % nádorových buněk nebo úplná negativita při pozitivní vnitřní kontrole (variabilně intenzivní jaderné expresi části stromálních buněk). Oproti tomu „divoký typ“ exprese představovala fokální variabilně intenzivní jaderná pozitivita části epitelových buněk (Kobel M. et al., 2010; McCluggage WG. et al., 2011). Pro protilátky HNF-1 β , p53, MLH-1, MSH-2, MSH-6, PMS-2, PTEN a β -katenin byla hodnocena pouze jaderná exprese, pro mTOR byla hodnocena pouze cytoplasmatická exprese a pro protilátku GLUT1 pouze membránová exprese.

3.3. Cytogenetická analýza

3.3.1. Fluorescenční in situ hybridizace

U skupiny 21 vzorků APA byly analyzovány numerické aberace genů *TP53* a *PTEN* metodou fluorescenční in situ hybridizace. K vyšetření aberací *TP53* byla použita sonda ZytoLight SPEC TP53 Dual Color Probe (ZytoVision, Germany), k vyšetření *PTEN* sonda PTEN Dual Color Probe (ZytoVision). Vzorky byly zpracovány podle instrukcí výrobce. Ve zkratce, 2-3 μ m silné řezy zhotovené z parafrinových bločků byly deparafrinovány v xylenu, vloženy do roztoku 0.2M HCl a následně do roztoku NaSCN při teplotě 80°C. Pak byly řezy naštěpeny Proteasou II (25 mg) po dobu 60 minut v 50 ml solného roztoku při pH 2,0 a fixovány v pufovaném formalínu. Poté byla aplikována FISH sonda, preparáty byly utěsněny tekutým pryžovým cementem a po dobu 1 minuty probíhala kodenaturace vzorku a DNA sondy při teplotě 75°C. Následovala hybridizace vzorků, která probíhla přes noc v

ThermoBrite systému (Dako) při teplotě 37°C. Vzorky byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem Olympus Provis AX70 microscope (Olympus, Tokyo, Japan). U každého vzorku bylo hodnoceno minimálně 100 jader (hranice pro numerické aberace byla stanovena na 10 % pozitivních jader).

3.4. Molekulárně biologická analýza

3.4.1. Izolace nukleových kyselin

Izolace nukleových kyselin z parafinových řezů byla provedena podle standardních postupů. Přibližně 10 µm silné řezy řezy z každého vzorku byly deparafinovány v xylenu. Poté byla extrahována DNA za použití QIAamp DNA mini kitu (Qiagen, Hamburg, Germany) v případě atypických polypózních adenomyomů a za použití GeneRead™ DNA FFPE kitu nebo QIAamp DNA FFPE tkáňového kitu (Qiagen, Hilden, Germany) v případě analýzy genu *HNFB*.

3.4.2. PCR- polymerázová řetězová reakce

Podmínky PCR byly následující: před zahájením procesu byla teplota na 10 minut zvýšena na 37°C, poté proběhla iniciační denaturace při 94 °C 3 minuty a následovalo 35 cyklů. Tyto cykly zahrnovaly: denaturaci 94 °C 1 min, 70 °C 50 sekund, nasednutí primerů (annealing) při 56 °C 50 sekund, syntézu (elongaci) DNA při 60 °C 1 minutu. Konečná syntéza pak probíhala při teplotě 60 °C po dobu 3 minut.

3.4.2.1 Analýza genů *KRAS* a *EGFR*

Analýza genů *KRAS* and *EGFR* prostřednictvím kitu StripAssay Kit (VienaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria) byla provedena podle instrukcí výrobce robotickým hybridizačním

systemem Bee20 (Bee Robotics Ltd, North Wales, United Kingdom). Gen *EGFR* byl testován pro mutace v exonech 18, 19, 20 a 21. Gen *KRAS* byl testován pro mutace v exonech 2 a 3 (kodony 12, 13, 61).

3.4.2.2. Analýza genu *NRAS*

Pro detekci mutací genu *NRAS* byl použit *NRAS* mutační analyzační kit (EntroGen, Los Angeles, USA), který analyzoval mutace v exonu 2 (kodon 12/13) a v exonu 3 (kodon 61) podle instrukcí výrobce využitím Light Cycleru LC480 (Roche, Basel, Switzerland).

3.4.2.3. Analýza genu *BRAF*

Analýza mutací V600 v exonu 15 genu *BRAF* byla provedena systémem Cobas® 4800 *BRAF* V600 Mutation Test (Roche) podle instrukcí výrobce.

3.4.3. Molekulární analýza metylace promotoru a mutací genu *HNF1B*

Metylační stav promotoru, mutace v kódujících oblastech a exon-intronových rozhraních genu *HNF1B* byl zkoumán u 33 endometriálních lézí (15 vzorků nádoru ze tkáně fixované ve formolu a zalité do parafínu, 18 vzorků nádoru a 15 korespondujících vzorků nenádorové tkáně mražené v tekutém dusíku) a u 15 světlobuněčných karcinomů ovaria (z parafinových bločků).

Izolace DNA v dostatečné kvalitě pro molekulární analýzu se podařila ze všech čerstvě zamražených tkání. V případě archivních bločků, tedy tkání fixovaných formalinem a zalitých do parafínu, byla úspěšnost izolace DNA vzhledem k její fragmentaci nižší. Kompletní mutační analýzu bylo u těchto vzorků možné provést pouze ve dvanácti případech z patnácti vyšetřovaných endometroidních karcinomů (80 %). Metylační analýza byla úspěšně provedena u patnácti z devatenácti vyšetřovaných vzorků (79 %) a kompletní mutační analýza

celé kódující oblasti byla provedena u dvanácti z devatenácti vyšetřovaných (63 %) světlobuněčných karcinomů ovaria. Obě analýzy, tedy vyšetření metylačního stavu promotorů i mutací ve všech devíti kódujících exonech genu *HNF1B*, se podařilo úspěšně provést u 10 z 15 vzorků endometroidních karcinomů a u 12 z 19 světlobuněčných karcinomů ovaria. Potvrdilo se, že charakter vstupního materiálu významně ovlivňuje kvalitu izolované DNA a tedy i kvalitu získaných výsledků. Nukleové kyseliny izolované z čerstvě zamražených tkání jsou nepoškozené, a oproti archivnímu materiálu tedy jejich DNA není fragmentovaná ani chemicky modifikovaná.

DNA byla izolována pomocí standartních kitů pro izolaci z čerstvě zamražených tkání QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nebo pro izolaci z parafinových bločků GeneRead™ DNA FFPE kit or QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen). Pro kvantifikaci DNA bylo použito fluorometrické měření na fluorometru Qubit (Thermo Scientific/Life Technologies) za použití reagensií dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies).

Modifikace vzorků DNA pro bisulfitové sekvenování byla provedena pomocí EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymoresearch) dle instrukcí výrobce. Do celé analýzy byly zahrnuty dvě kontroly, nemetylovaná i metylovaná DNA (Human HCT116 DKO Non-Methylated DNA and Human HCT116 DKO Methylated DNA; Zymoresearch). Cílový fragment byl amplifikován pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a sekvenován přímým Sangerovým sekvenováním. Primery užívané pro PCR amplifikaci oblasti promotoru a bisulfitové sekvenování modifikované DNA byly navrženy pomocí softwaru <http://www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker>. Primery pro mutační analýzu v exonech 1 až 9 a přilehlých intronových sekvencích byly použity pro PRC reakci a přímé Sangerovo sekvenování. Produkty PCR byly amplifikovány s využitím 5x HOT FIREPol EvaGreen HRM Mix NO ROX (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) dle instrukcí výrobce. Primery a velikosti PCR amplikonů jsou uvedeny v tabulce 1.

Pro sekvenační reakci byl použit BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City) a separace byla provedena na ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems). Každý mutovaný nebo suspektní fragment byl verifikován další nezávislou PCR amplifikací a sekvenční analýzou. Pro vyhodnocení sekvencí byla použita referenční sekvence NM_000458.3 *HNF1B* (alternativně TCF2) genu z databáze NCBI. Sekvence 95-695 bází před adeninem startovacího kodonu ATG byla definována jako předpokládaná oblast promotoru dle RefSeq (na základě UCSC/NCBI Assembly, NCBI Build 35, UCSC Version 17).

Pojmenování variant se řídí dle doporučení Human Genome Variation Society (HGVS). Mutace, které nebyly nalezeny do září 2015 v databázi jednonukleotidových variant (Single Nucleotide Polymorphism Database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) nebo v katalogu somatických variant (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer; <http://www.sanger.ac.uk/cosmic>) byly považovány za nové (Forbes SA. et al., 2011). Předpokládané účinky missense variant na biologickou funkci proteinu a stabilitu byly zhodnoceny *in silico* analýzou (počítačové modely) pomocí standardně používaných programů PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>) a MUpro (<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu>).

4. VÝSLEDKY

4.1. Karcinomy děložního hrdla

Imunohistochemická analýza 155 karcinomů děložního hrdla s protilátkami proti estrogenovým receptorům, progesteronovým receptorům, CEA, p63, p40, p16 a D2-40, zahrnující 56 adenokarcinomů, 85 dlaždicobuněčných karcinomů a 14 vzorků nediferencovaných karcinomů, jejíž kompletní shrnutí výsledků je uvedeno v tabulce 2, vyzněla následovně:

4.1.1. Adenokarcinomy děložního hrdla

Ve 42/56 (75 %) vzorcích z adenokarcinomů děložního hrdla jsme prokázali expresi HNF-1 β , z čehož dvacet sedm vzorků vykazovalo 3+ pozitivitu, 8 vzorků 2+ pozitivitu a 7 vzorků bylo pozitivní pouze fokálně 1+ (Obr. 1-3). Nejvyšší intenzitu barvení jsme prokázali ve skupině 3+ pozitivních karcinomů, ve které byly dva vzorky silně intenzivně pozitivní, sedmnáct středně intenzivně pozitivních a osm vzorků vykazovalo slabou intenzitu positivity. Ve skupině 2+ a 1+ pozitivních lézí se intenzita barvení pohybovala od mírně po středně silně pozitivní.

Souběžnou expresi markerů p63 a p40 jsme našli u 2/65 (3,6 %) karcinomů a v dalších dvou případech byla prokázána 1+ pozitivní exprese p63 bez simultánní exprese p40. Pozitivitu estrogenových receptorů jsme prokázali u 9/56 (16,1 %) adenokarcinomů, z čehož dva byli 3+, jeden 2+ a zbývajících šest slabě 1+ pozitivních. V pěti z těchto případů byla také zastižena souběžná exprese progesteronových receptorů. Průkaz CEA byl pozitivní v 48/56 (85,7 %) adenokarcinomech a pozitivitu p16 vykazovalo všech 56 adenokarcinomů. V žádném z adenokarcinomů nebyla zastižena pozitivita D2-40.

4.1.2. Dlaždicobuněčné karcinomy děložního hrdla

Ve skupině dlaždicobuněčných karcinomů byla zastižena exprese HNF-1 β pouze ve 2/85 (2,4 %) případech (Obr. 4-5). V jednom z nich se jednalo o pozitivitu přibližně 70 % a ve druhém 30 % nádorových buněk. Oba případy vykazovaly zároveň silnou expresi proteinu p16, p63 a p40a současně byly 1+ a 2+ pozitivní při průkazu CEA.

Ve všech případech dlaždicobuněčných karcinomů zastižena jaderná exprese p63 and p40. V 9/85 (10,6 %) dlaždicobuněčných karcinomech jsme prokázali pozitivitu estrogenových receptorů a v jednom z těchto případů i souběžnou pozitivitu progesteronových receptorů. Průkaz CEA byl pozitivní v 77/85 (90,6 %) vzorků. Exprese proteinu p16 byla zastižena u všech dlaždicobuněčných karcinomů kromě jednoho případu, který byl ale zároveň negativní při průkazu HNF-1 β , estrogenových receptorů, progesteronových receptorů i CEA a vykazoval silně intenzivní pozitivitu (3+) při průkazu p63 a p40. Pozitivita D2-40 byla zastižena v 45/84 (53,6 %) vzorků dlaždicobuněčných karcinomů.

4.1.3. Nediferencované karcinomy děložního hrdla

U nediferencovaných karcinomů děložního hrdla jsme prokázali expresi HNF-1 β ve 2/14 (14,3 %) případů, z nichž jeden byl silně intenzivně pozitivní přibližně v 70 % nádorových buněk a ve druhém byla nalezena silná intenzita exprese přibližně v 10 % nádorových buněk (Obr. 6). Při průkazu estrogenových a progesteronových receptorů byly oba tyto případy negativní. Příklad s extenzivnější pozitivitou HNF-1 β byl zároveň CEA, p63 a p40 negativní a vykazoval 1+ pozitivitu při průkazu p16. Druhý případ, s nižší pozitivitou HNF-1 β , byl 2+ CEA pozitivní, p16 3+ pozitivní, p63 1+ pozitivní a p40 negativní. Histochemickým průkazem kyselých mukosubstancí alcianovou modří při pH 2,5 jsme v žádném z těchto případů hlenotvorbu nezastihli.

Expresi CEA jsme prokázali v 8/14 (57,1 %) případů. Všechny nediferencované karcinomy vykazovaly pozitivitu při průkazu p16 a negativitu při průkazu estrogenových receptorů a progesteronových receptorů. Průkaz p63 byl pozitivní v 7/14 (50 %) případů a p40 v 5/14 (35,7 %) případů. Obě tyto protilátky byly současně pozitivní v 5 případech, z čehož čtyři byly 3+ a jeden 1+ pozitivní. Zbýlé dva p63 pozitivní případy (1+ a 2+) byly p40 negativní. Pouze jeden z p63/p40 pozitivních případů zároveň vykazoval pozitivitu při průkazu D2-40, ostatní nediferencované karcinomy byly negativní.

4.2. Karcinomy děložního těla

Analýza karcinomů děložního těla provedená na skupině 180 endometroidních karcinomů, 27 serózních karcinomů a 18 světlobuněčných karcinomů vyzněla následovně:

4.2.1. Endometroidní karcinomy děložního těla

Ve skupině endometroidních karcinomů jsme prokázali expresi HNF-1 β ve 51/180 (28,3 %) nádorů, přičemž většina případů vykazovala slabou a pouze pět případů až středně silnou intenzitu exprese (Obr. 7). V žádném endometroidním karcinomu nebyla zastižena silná jaderná exprese HNF-1 β . Poměr pozitivních případů se ve skupině dobře diferencovaných a středně diferencovaných nádorů příliš nelišil. U dobře diferencovaných karcinomů byla zastižena pozitivita ve 25/77 (32,5 %) nádorů a u středně diferencovaných u 24/73 (32,9 %) nádorů. Oproti tomu ve skupině nízce diferencovaných karcinomů bylo zastoupení HNF-1 β pozitivních nádorů významně nižší, pozitivních bylo pouze 2/30 (6,7 %) nádorů. Celkem bylo zastiženo devět 3+, čtrnáct 2+ a dvacetosm 1+ pozitivních endometroidních karcinomů.

4.2.2. Serózní karcinomy děložního těla

Serózní karcinomy vykazovaly pozitivní expresi HNF-1 β v 7/27 (25,9 %) případech, ve dvou 1+ a v pěti 3+. Intenzita barvení byla slabá ve třech případech, středně silná v dalších třech případech a silná pouze v jediném 3+ pozitivním nádoru.

4.2.3. Světlobuněčné karcinomy děložního těla

U světlobuněčných karcinomů jsme našli pozitivitu HNF-1 β v 15/18 (83,3 %) případech, z čehož bylo jedenáct 3+, dva 2+ a dva fokálně 1+ pozitivní. V jedenácti případech byla zastižena silná, ve třech středně intenzivní a pouze v jednom 1+ vzorku byla zastižena slabá intezita exprese HNF-1 β (Obr. 7).

4.3. Světlobuněčné karcinomy ovaria

Ve světlobuněčných karcinomech ovaria byla v 18/19 (94,7 %) nádorech prokázána jaderná exprese HNF-1 β , ve čtrnácti případech s 3+ pozitivitou, čtyři případy vykazovaly 2+ pozitivitu a pouze jeden byl negativní. V šesti případech byla zastižena středně silná a ve 12 silná jaderná exprese HNF-1 β .

4.4. Nenádorové tkáně hrdla a těla děložního

Analýza 175 vzorků nenádorových tkání a lézí ženského genitálu vyzněla následovně:

4.4.1 Nenádorová tkáň hrdla a čípku děložního

Při analýze karcinomů děložního hrdla nebyla v žádném z 59 vzorků, ve kterých byl vyšetřen i nenádorový vrstevnatý dlaždicový epitel, zastižena pozitivita tohoto epitelu při průkazu HNF-1 β . Nenádorové endocervikální žlázy a povrchový cylindrický epitel byly zastiženy u 33 z těchto 59 vyšetřených vzorků, přičemž pozitivita při průkazu HNF-1 β

nalezena ve 21/33 vzorcích (63,6 %), v devatenácti případech se slabou intenzitou a ve dvou případech se středně silnou intenzitou.

4.4.2 Nenádorové tkáně a léze těla děložního

Při analýze exprese HNF-1 β ve žlazkách korporálního endometria v různých fázích děložního cyklu byla prokázána exprese v 16/18 (88,9 %) vzorcích proliferativního endometria (jeden 1+, čtyři 2+, jedenáct 3+), ve všech 15/15 vzorcích sekrečního endometria (jeden 1+, jeden 2+, třináct 3+) a ve 4/5 (80 %) atrofického endometria (všechny čtyři 3+). Vzorky z atrofického endometria vykazovaly pouze slabou intenzitu, vzorky proliferativního endometria slabou a v osmi případech až středně silnou intenzitu exprese. Ve vzorcích ze sekrečního endometria byla zastižena převážně středně silná a místy silná intenzita exprese (Obr. 7). Výjimkou byly dva vzorky (1+ a 2+), které vykazovaly pouze slabou expresi, nicméně nález byl v obou těchto vzorcích mírně limitován autolýzou.

Vzorky z endometria s hyperplazií bez atypií vykazovaly pozitivitu HNF-1 β v 10/11 (90,9 %) případech (dva 1+, tři 2+, pět 3+) a vzorky s atypickou hyperplazií endometria v 14/16 (87,5 %) případech (osm 1+, dva 2+, čtyři 3+). Ve všech vzorcích jsme prokázali slabě až středně silnou intenzitu barvení.

Ve všech 16 vzorcích hyperplastických polypů bez atypií (čtyři 2+, dvanáct 3+) a ve 13/14 (92,9 %) hyperplastických polypech s atypii (tři 1+, pět 2+, pět 3+) jsme prokázali slabě a až středně silně intenzivní pozitivitu HNF-1 β .

4.5. Molekulární analýza metylace promotoru a mutací genu *HNF1B*

4.5.1. Analýza epigenetických změn

Pro sledování metylace či demethylace promotoru jsme vyšetřili bisulfitovým sekvenováním oblast promotoru obsahující tři CpG ostrůvky (Obr. 8). Methylace v oblasti promotoru byla detekována u 4 ze 30 (13,3 %) vzorků endometroidních karcinomů děložního těla (jeden z parařinového bločku a tři ze vzorků čerstvě zamražené tkáně). Stejná oblast vyšetřená v korespondující nenádorové tkáni metylovaná nebyla. Nenádorová tkáň byla dostupná pro tři ze čtyř metylovaných nádorů. V žádném z patnácti vyšetřených vzorků ze skupiny světllobuněčných karcinomů ovaria jsme metylaci promotoru nedetekovali.

4.5.2. Mutační analýza

Přímé Sangerovo sekvenování jsme využili pro vyšetření kódujících sekvencí genu *HNFI1B*. Ve skupině 30 endometroidních karcinomů děložního těla jsme detekovali 4 různé jednonukleotidové varianty u čtyř případů. U jedné pacientky s dobře diferencovaným endometriodním karcinomem diagnostikovaným ve věku 72 let byla v nádorové tkáni z parařinového bločku nalezena nonsense varianta v exonu 2 (c.454C>T; p.Gln152X) vedoucí k posunu čtecího rámce, předčasné terminaci translace a ke vzniku zkráceného proteinového produktu (Obr. 8). Dále se nám podařilo prokázat tři genové varianty nejasného významu: Jedna detekovaná varianta byla nukleotidová záměna v exonu 3 (c.585C>T, p.Asp195), která nevede v translatovaném proteinu ke změně smyslu aminokyseliny, nicméně by mohla mít vliv na stabilitu proteinu. Další dvě nekódující varianty jsou lokalizovány v intronu 2 (c.545-25c>a) a v intronu 3 (c.809+27c>t), obě v blízkosti exonu 3, nicméně jejich funkční význam je nejasný.

Ve skupině světllobuněčných karcinomů ovaria jsme také detekovali u jednoho případu missense variantu v exonu 4 vedoucí ke změně aminokyseliny 283 z Alaninu na Valin (c.848C>T, p.Ala283Val). Tato varianta postihuje DNA vazebnou doménu (aminokyseliny 231-331).

Všechny 3 exonové varianty byly heterozygotní tranzice C>T a byly popsány poprvé (Single Nucleotide Polymorphism Database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>; Catalogue of Somatic Mutations in Cancer; <http://www.sanger.ac.uk/cosmic>).

K potvrzení somatického stavu detekovaných variant nebyla dostupná nenádorová tkáň nebo krev pacientek, a proto jsme nemohli potvrdit, zda se jedná o somatickou variantu. Nicméně signál mutované alely na elektroforeogramu sekvenační analýzy byl nižší než druhý wild-type signál odpovídající nemutované populaci buněk, což je typické pro somatické varianty. Pro srovnání hereditární neboli zárodečné mutace se nacházejí ve všech buňkách a proto heterozygotní varianty vykazují stejnou výšku wild-type i mutovaného signálu. Nonsense mutace p.Gln152X i missense varianta p.Ala283Val byly obě vyhodnocena „*in silico*“ modely jako patogenní.

Korelace genetických či epigenetických variant s expresí HNF-1 β proteinu nebyla vzhledem k malému počtu případů možná. Nicméně u 4 případů s metylací promotoru jsme imunohistochemicky zaznamenali slabou expresi nebo negativitu HNF-1 β , zatímco ve skupině s nemetylovaným promotorem jsme detekovali silnou pozitivitu exprese tohoto proteinu.

4.6. Atypické polypózní adenomyomy

4.6.1. Imunohistochemická analýza atypických polypózních adenomyomů

Ve skupině APA byla přítomna jaderná exprese HNF-1 β převážně jen ve žlazové komponentě a pouze v jediném vzorku byla zastižena fokální pozitivita ve skvamózní/morulární komponentě, která však nedosahovala 5 % a celkově byla vyhodnocena jako negativní. Ve žlazové komponentě jsme prokázali pozitivitu v 16/21 (76,19 %) vzorků: jeden případ 1+, čtyři případy 2+, šest případů 3+ a pět případů 4+. Intenzita

exprese se pohybovala od slabé po středně silnou. V mnoha vzorcích se kromě jaderné vyskytovala i slabá cytoplazmatická pozitivita, která byla považována za nespecifickou.

Při podrobnější imunohistochemické analýze těchto vzácných lézí se nám podařilo prokázat ztrátu exprese PTEN u 6/19 (31,58 %) vzorků a expresi β -kateninu u 17/21 (80,95 %) vzorků a to extenzivněji a intenzivněji ve skvamózní/morulární komponentě. Dále jsme zastihli cytoplazmatickou expresi mTOR v 19/21 (90,5 %) vzorků omezenou převážně na žlázovou komponentu lézí, expresi GLUT1 u 20/21 (95,2 %) vzorků, kde byla opět nalezena vyšší pozitivita ve žlázové komponentě lézí. Proteiny mikrosatelární instability (MLH-1, MSH-2, MSH-6 a PMS-2) byly intaktní, nebyla tedy zjištěna ztráta exprese žádného z hlavních ani vedlejších proteinů. P53 vykazoval „divoký typ“ exprese. Podrobnější přehled imunohistochemických nálezů je uveden v tabulce 5.

4.6.2. Molekulární analýza atypických polypózních adenomyomů

4.6.2.1. Analýza atypických polypózních adenomyomů metodou FISH

Cytogenetickou metodou FISH se nám podařilo prokázat delecí *PTEN* u 4/21 (19,1 %) vzorků, respektive u 3 ze 17 pacientek. V jednom z těchto případů byla delecce detekovaná metodou FISH zároveň doprovázena imunohistochemickou ztrátou exprese PTEN. Tato pacientka měla rekurentní/persistující lézi a ztráta exprese doprovázená delecí *PTEN* byla přítomna v primární i v rekurentní/persistující lézi. Ve dvou dalších vzorcích nebyla imunohistochemická ztráta exprese zastižena.

Numerické aberace genu *TP53* metodou FISH (delece či amplifikace) jsme v žádném ze vzorků neprokázali. Podrobnější přehled molekulárně genetických nálezů je uveden v tabulce 6.

4.6.2.2. Analýza atypických polypózních adenomyomů metodou PCR

Při vyšetření mutačního stavu genu *KRAS* metodou PCR byly zastiženy v 5/19 (26,3 %) vzorcích, respektive u 4/16 pacientek, mutace v kodonu 12 (ve třech vzorcích Gly12Asp, v jednom Gly12Cys a v jednom Gly12Ala). Zbýlých 14 vzorků bez zastižených mutací bylo klasifikováno jako „divoký typ“.

V genech *NRAS*, *BRAF* a *EGFR* nebyla metodou PCR v daných exonech prokázána přítomnost mutací a byly tedy klasifikovány jako „divoký typ“. Podrobnější přehled molekulárně genetických nálezů je uveden v tabulce 6.

5. DISKUSE

Exprese proteinu HNF-1 β byla v oblasti nádorů ženského genitálu roku 2003 popsána jako první relativně specifický marker světlbuněčných karcinomů ovaria (Tsuchiya A. et al., 2003). Poté následovalo několik studií, které se zabývaly expresí HNF-1 β v nádorech i nenádorových lézích ženského genitálu, tyto studie analyzovaly expresi tohoto markeru v endometrióze, normálním endometriu a v některých nádorech děložního čípku, děložního těla a ovarií (Huang W. et al., 2016; Fadare O. et Liang SX. 2012; Park KJ. et al., 2011; Kenny SL. et al., 2012; Tomassetti A. et al., 2008). Většina z časnějších studií prokázala, že exprese HNF-1 β je omezena převážně na světlbuněčné karcinomy a vyhodnotila tedy HNF-1 β jako marker pro tento typ nádorů specifický (Yamamoto S. et al., 2007; Kato N. et al., 2006; Kato N. et al., 2008; Tsuchiya A. et al., 2003). Nicméně v řadě recentnějších studií zaměřených na tuto problematiku, byla autory popsána exprese proteinu HNF-1 β nejen ve světlbuněčných karcinomech ale i v dalších typech karcinomů, včetně karcinomů serózních, endometroidních a mucinózních, a navíc byla prokázána i ve většině typů borderline nádorů ovaria (Huang W. et al., 2016; Park KJ. et al., 2011; Fadare O. et Liang SX., 2012; Kalloger SE. et al., 2011; Tomassetti A. et al., 2008).

Práce, ve kterých je popisována exprese HNF-1 β v nenádorových lézích ženského genitálu, jsou převážně zaměřeny na průkaz exprese tohoto markeru v endometrióze, zejména v endometrióze s atypii nebo se zánětlivými změnami, která je považována za předpokládaný prekursor světlbuněčného karcinomu (Kato N. et Motoyama T., 2009). Pouze v několika málo studiích, primárně však zaměřených na nádorovou problematiku, byla popsána pozitivita HNF-1 β v nenádorovém endometriu, a to zvláště v sekrečním či v endometriu gestačního typu (Tomassetti A. et al., 2008; Yamamoto S. et al., 2007). V povrchovém epitelu ovarií nebyla pozitivní exprese HNF-1 β nalezena, nicméně v jedné

studii je popisována pozitivita v některých ovariálních inkluzních cystách (Tomassetti A. et al., 2008).

V naší práci jsme se nejprve zaměřili na analýzu exprese HNF-1 β v karcinomech děložního hrdla, u kterých podrobnější systematická analýza na takto velkém souboru případů dosud provedena nebyla. V dlaždicobuněčných karcinomech děložního hrdla nebyla exprese HNF-1 β dosud zkoumána vůbec a v adenokarcinomech děložního hrdla byla zmíněna pouze ve dvou studiích, které ale nebyly primárně cíleny na problematiku exprese tohoto proteinu a navíc v nich byly hodnoceny jen některé vybrané typy adenokarcinomů. Jedna z těchto studií byla zaměřena na stav HPV a na imunohistochemický profil neobvyklých histologických subtypů karcinomů děložního hrdla (Park KJ. et al., 2011). V této studii byla prokázána HNF-1 β pozitivita v 7/9 (78 %) světlobuněčných karcinomech, ve 2/5 (40 %) endocervikálních karcinomech obvyklého typu, ve 3/11 (27 %) endocervikálních karcinomech gastrického typu, ve 3/3 (100%) minimálně deviovaných karcinomech, v 1/1 (100 %) mezonefrickém adenokarcinomu, v 1/1 (100 %) serózním karcinomu a v 1/1 (100 %) maligním smíšeném Müllerianském tumoru. Druhá studie byla primárně zacílena na imunohistochemickou analýzu mezonefrických karcinomů, u kterých byla exprese HNF-1 β nalezena ve 3/7 případech (42,8 %) (Kenny SL. et al., 2012).

V naší práci jsme analyzovali expresi HNF-1 β v adenokarcinomech, dlaždicobuněčných a nediferencovaných karcinomech děložního hrdla. Hlavním důvodem, proč jsme vybrali tyto typy nádorů, byla skutečnost, že rozlišení mezi nízce diferencovanými adenokarcinomy a dlaždicobuněčnými karcinomy hrdla založené na pouze na histologických znacích je u části nádorů obtížné a v některých případech dokonce nemožné. Nicméně z klinického hlediska je určení přesného histologického typu nádoru významné a může vést k modifikaci následné terapie, zejména s ohledem na radiosenzitivitu dlaždicobuněčných karcinomů. Obě výše uvedené studie popisovaly pozitivní expresi HNF-1 β v některých typech

adenokarcinomů děložního hrdla, zatímco v našem limitovaném souboru předběžně vyšetřených případů dlaždicobuněčných karcinomů jsme tuto expresi našli pouze zcela ojediněle. Předpokládali jsme tedy, že pokud by se nám podařilo prokázat odlišnou míru exprese HNF1- β v těchto typech karcinomů děložního hrdla na větším reprezentativním souboru případů, mohla by být imunohistochemická exprese tohoto proteinu potencionálně využitelná jako pomocný marker při diferenciální diagnostice málo diferencovaných karcinomů děložního hrdla.

V rámci naší analýzy jsme se pokusili stanovit algoritmus imunohistochemického vyšetřování, který by mohl být nápomocný při diferenciální diagnostice těchto morfologicky nejednoznačných karcinomů hrdla, a s ohledem na to jsme také vybrali soubor vyšetřovaných protilátek. Ke správnému určení diagnózy u málo diferencovaných karcinomů hrdla nám mohou pomoci markery stratifikovaného epitelu, jako jsou protilátky proti p63 nebo p40. Kromě toho by se dala využít i protilátka D2-40, jejíž exprese byla několika autory popsána v podskupině dlaždicobuněčných karcinomů (Dumoff KL. et al., 2005; Chuang WY. et al., 2009; Yuan RH. et al., 2006). Naopak další markery jako jsou CEA, cytokeratin 7, estrogenové a progesteronové receptory se neukázaly v diferenciální diagnostice obou typů nádorů jako příliš užitečné (Toki T. et al., 1991; Shen K. et al., 1994).

V našem souboru případů jsme v souladu s původním předpokladem našli expresi HNF-1 β ve 42/56 případech adenokarcinomů (75 %) a pouze ve 2 z 85 případů (2,4 %) dlaždicobuněčných karcinomů. Exprese D2-40 byla nalezena u 45/84 dlaždicobuněčných karcinomů (53,6 %), negativita tohoto markeru byla u všech 56 adenokarcinomů. Markery stratifikovaného epitelu p63 a p40 jsme ve stejném rozsahu našli ve 2/56 adenokarcinomech (3,6 %) a ve všech 85/85 dlaždicobuněčných karcinomech (100 %). Navíc jsme prokázali slabou expresi p63 bez současné exprese p40 ve dvou dalších případech adenokarcinomu. Vzhledem k tomu, že protein HNF-1 β byl převážně exprimován v adenokarcinomech a

protilátky D2-40, p63 a p40 v dlaždicobuněčných karcinomech děložního hrdla, rozdělili jsme skupinu nediferencovaných karcinomů na základě imunohistochemického profilu do tří skupin: pravděpodobné adenokarcinomy (2/14 případů; 14,3 %) charakterizované pozitivitou HNF-1 β a negativitou p40 a D2-40; pravděpodobné dlaždicobuněčné karcinomy (5/14 případů; 35,7 %) charakterizované pozitivitou p40/p63, variabilní expresí D2-40 a negativitou HNF-1 β ; a nediferencované karcinomy, blíže nezařaditelné („not otherwise specified – NOS“) (7/14 případů; 50 %) charakterizované negativitou HNF-1 β , p63/p40 a D2-40. Přehled protilátek, které by mohly být využitelné v diferenciální diagnostice adenokarcinomů a dlaždicobuněčných karcinomů děložního hrdla je uveden v tabulce 3.

Dále jsme analyzovali expresi HNF-1 β v karcinomech děložního těla. Karcinomy endometria rozdělujeme do jednotlivých histologických typů většinou na základě morfologických znaků. Nicméně v některých případech je i u těchto nádorů přesné určení histologického typu nádoru obtížné. V určitých případech bývá např. značně nesnadné odlišit světlobuněčné karcinomy endometria od jiných typů endometriálních karcinomů, které pouze vykazují světlobuněčnou přeměnu. Přesná diagnóza světlobuněčných karcinomů je však velmi důležitá, protože jde high grade tumory s odlišnou odpovědí na konvenční chemoterapii než mají ostatní typy karcinomů endometria. V diagnosticky obtížných případech by nám mohla pomoci imunohistochemie.

Výsledky studií zabývající se touto problematikou ukazují, že HNF-1 β je marker relativně senzitivní pro světlobuněčné karcinomy, nicméně podle recentnějších prací je jeho specifická je nižší, než se původně předpokládalo a jeho pozitivita může být často zastižena i u dalších typů nádorů děložního těla i nenádorových lézí. V současné době se nově objevují i další markery světlobuněčných karcinomů, které by mohly být v této oblasti diferenciální diagnostiky využity.

V jedné z recentních studií zaměřené na tuto problematiku, která byla provedena na skupině endometroidních karcinomů, endometroidních karcinomů se světlobuněčnou přeměnou a světlobuněčných karcinomů děložního těla a ovaria, byla autory nalezena obdobná senzitivita HNF-1 β i napsinu A (89,1 % oproti 87,5 %). Nicméně specifická HNF-1 β byla nižší než u napsinu A (55,9 % u HNF-1 β oproti 93 % u napsinu A) (Lim D. et al., 2015). Další recentní studie zkoumala expresi HNF-1 β , napsinu A a AMACR v poměrně velkém souboru 279 ovariálních nádorů (Fadare O. et al., 2015). Pozitivita HNF1- β a napsinu A byla v této práci zastižena u 92 % versus 82 % světlobuněčných karcinomů, u 7 % versus 1 % serózních karcinomů, 37 % versus 5,3 % endometroidních karcinomů, u 60 % versus 0 ze skupiny mucinózních nádorů, ve všech (100 %) versus v žádném nádoru ze žloutkového váčku. Pozitivita AMACR byla ve všech těchto nádorových skupinách podstatně nižší. Tato studie potvrdila, že HNF1- β je vysoce senzitivní, ale suboptimálně specifický marker, zatímco AMACR je sice vysoce specifický, ale suboptimálně senzitivní, napsin A vykazoval přibližně intermediální senzitivitu.

Expresi HNF-1 β v karcinomech endometria se věnovala i další práce, ve které autoři hodnotili celkem 45 endometriálních karcinomů (v 15 světlobuněčných karcinomech, v 15 serózních karcinomech a v 15 níže diferencovaných endometroidních karcinomech) (Hoang LN. et al., 2014). Ve studii byla nalezena silná jaderná exprese HNF-1 β ve 100 % světlobuněčných karcinomech a slabá až středně silně intenzivní exprese ve 3/15 (20 %) endometroidních karcinomech (ve více než 25 % nádorových buněk). Ve skupině serózních karcinomů bylo prokázáno 5/15 (33,3 %) zcela negativních případů, 4/15 (26,7 %) byly fokálně slabě a středně intenzivně pozitivní (ve více než 25 % nádorových buněk), a 6/15 (40 %) vzorků vykazovalo difúzní silně intenzivní pozitivitu. I tato práce tedy prokazuje poměrně nižší specifitu HNF-1 β pro světlobuněčné karcinomy endometria při vysoké senzitivitě.

V našem souboru případů jsme našli ve skupině karcinomů endometria převážně středně silnou až silnou intenzitu exprese HNF-1 β v 15/18 (83,3 %) světlobuněčných karcinomech, slabou a v několika případech až středně silnou intenzitu exprese v 51/180 (28,3 %) endometroidních karcinomech, slabou a v jednom případě silnou intenzitu exprese v 7/27 (25,9 %) serózních karcinomech. V kontrolní skupině světlobuněčných karcinomů ovaria jsme našli místy středně silnou a převážně silnou intenzitu exprese HNF-1 β v 18/19 (94,7 %) případů. Prokázali jsme tedy dle původních předpokladů, že HNF-1 β je vysoce senzitivní marker pro světlobuněčné karcinomy ovaria i endometria, nicméně jeho specificita zejména pro světlobuněčné karcinomy endometria není dostatečně vysoká a pozitivní exprese tohoto proteinu může být zastižena i u jiných typů nádorů. Naše výsledky se významně nelišily od výsledků ostatních recentních studií.

Ve skupině endometroidních karcinomů jsme kromě toho prokázali různou míru exprese HNF-1 β v závislosti na stupni diferenciaci nádoru. Nízce diferencované endometroidní karcinomy vykazovaly ve srovnání s karcinomy dobře či středně dobře diferencovanými pozitivitu pouze vzácně.

Dále se ukázalo, že se různé typy nádorů mohou lišit intenzitou exprese. Silná intenzita exprese HNF-1 β byla v naší i dalších studiích omezena převážně na světlobuněčné karcinomy a ostatní typy nádorů (kromě ojedinělých případů serózních karcinomů) vykazovaly pouze slabou až středně silnou intenzitu positivity. V žádném, ať už našem či jiném publikovaném souboru endometroidních karcinomů, nebyla u tohoto typu nádoru prokázána silná intenzita exprese, a význam intenzity exprese na imunohistochemické úrovni či úrovni exprese mRNA by mohl být předmětem dalších výzkumů.

Expres HNF-1 β v nenádorových lézích byla dosud popsána převážně ve studiích, které se zabývaly významem exprese tohoto markeru v endometrióze, a kromě toho okrajově v několika studiích většinou však primárně zaměřených na problematiku nádorovou. Ve

studiích věnujících se endometrióze autoři prokázali pozitivitu HNF-1 β v některých případech endometriózy, zejména v endometrióze atypické nebo se zánětlivými změnami, které jsou považovány za předpokládaný prekursor světlobuněčných karcinomů především ovariálních (Kato N. et Motoyama T., 2009). Vzhledem k tomu, že touto problematikou se již zabývala celá řada studií a přehledových článků, ve kterých byla podrobně analyzována a i na molekulární úrovni, jsme se jí v naší práci nevěnovali (Kato N. et al., 2006; Kobayashi H. et al., 2009).

V nenádorovém endometriu byla exprese HNF-1 β zmíněna pouze v ojedinělých studiích, z nichž vyplývá, že HNF-1 β je v endetriu silně exprimován převážně v sekreční fázi menstruačního cyklu nebo při graviditě (Yamamoto S. et al., 2007). Pozitivita HNF-1 β byla ve zmíněné studii nalezena v 11/12 (92 %) vzorků sekrečního endometria, ve 2/5 (40 %) menstruačního endometria, v 1/5 (20 %) proliferálního endometria a v 7/7 (100 %) gestačního endometria.

V našem souboru případů byla nalezena převážně středně silně intenzivní pozitivita HNF-1 β ve všech 15 (100 %) vzorcích sekrečního endometria, převážně slabě až fokálně středně silná intenzita exprese v 16/18 (88,9 %) vzorcích proliferálního endometria a fokální slabá intenzita exprese ve 4/5 (80 %) vzorků atrofického endometria. Vyšší procentuální pozitivita v naší skupině vzorků proliferálního endometria by mohla být vysvětlena jednak tím, že ve studiích byly použity různé protilátky od různých výrobců a navíc může být dána poměrně malým počtem vzorků. Nálezy různé extenzity i intenzity exprese v různých fázích cyklu naznačují, že HNF-1 β by mohl být ovlivňován pohlavními steroidními hormony či v případě gravidity choriovým gonadotropinem.

Kromě normálního endometria v různých fázích menstruačního cyklu jsme analyzovali i hyperplastické endometrium atypické i bez atypií, endometriální polypy s hyperplazií bez atypií i s hyperplazií atypickou. V těchto skupinách jsme našli převážně

slabou a fokálně až středně silnou expresi HNF-1 β ve 16/16 (100 %) polypů bez atypií a v 13/14 (92,9 %) polypů s atypiemi, v 10/11 (90,9 %) hyperplastických endometrií bez atypií a v 14/16 (87,5 %) hyperplazií atypických. V žádném z těchto vzorků tedy nebyla prokázána silná jaderná exprese. Na základě nálezů exprese HNF-1 β v nenádorovém endometriu i v prekancerózních lézích se nedomníváme, že by tento marker mohl být využitelný pro diferenciální diagnostiku těchto lézí endometria.

Vzhledem k tomu, že se transkripční faktor HNF-1 β pravděpodobně podílí na karcinogenezi různých typů nádorů, včetně endometroidních karcinomů, byla součástí našeho výzkumu byla i molekulární analýza metylace promotoru a mutací genu *HNF1B* (Buchner A. et al., 2010; Cereghini S. et al., 1992; Kim L. et al., 2008; Hoang LN. et al., 2014). Recentní celogenomové studie naznačují, že některé genetické varianty genu *HNF1B* jsou asociovány s rizikem vzniku diabetes mellitus II typu a se sníženým nebo naopak zvýšeným rizikem vzniku různých typů nádorů, včetně endometroidního karcinomu děložního těla a serózního karcinomu ovaria (Pontoglio M., 2000; Shen H. et al., 2013; Painter JN. et al., 2015; Spurdle AB. et al., 2011; Mandato VD. et al., 2015; Pharoah PD. et al., 2013). Nicméně přesný mechanismus, kterým se *HNF1B* podílí na procesu karcinogeneze, zůstává neznámý a pravděpodobně je odlišný u různých typů nádorů.

HNF1B se v různých typech nádorů chovat jako tumor supresorový gen nebo onkogen a navíc bylo prokázáno, že downregulace tohoto genu je u světlobuněčných karcinomů ledviny a prostaty asociována s horší prognózou (Buchner A. et al., 2010; 30. Noto H. et al., 2010). U světlobuněčných karcinomů ovaria je situace odlišná. Promotor genu *HNF1B* je typicky nemetylovaný a genová exprese je ve srovnání s ostatními typy ovariálních karcinomů zvýšena (Shen H. et al., 2013; Tsuchiya A. et al., 2003). V jedné studii bylo prokázáno, že „knock-down“ genu *HNF1B* vede ve světlobuněčných karcinomech ovaria k indukci apoptózy (Tsuchiya A. et al., 2003). Tento nález dobře koreluje s výsledky recentní

studie, která prokázala, že upregulace genu *HNF1B* zánětlivými cytokiny NF-κB/p65 snižuje náchylnost světlobuněčných karcinomů ovaria k apoptóze (Suzuki E. et al., 2015).

Naše výsledky korespondují s výše uvedenými studiemi. V žádném z 15 případů kontrolní skupiny světlobuněčných karcinomů ovaria jsme metylaci bisulfitovým sekvenováním neprokázali. Oproti tomu ve skupině endometroidních karcinomů děložního těla, jsme detekovali metylaci promotoru genu *HNF1B* v 13,3 % (4 případech z 15). Při analýze stejné oblasti korespondující nenádorové tkáně, která byla dostupná v 15 vzorcích, jsme metylaci neprokázali. Metylace promotoru genu *HNF1B* byla nalezena v některých buněčných liniích karcinomů pankreatu, kolorektálních karcinomů, gastrických a ovariálních nádorů (Terasawa K. et al., 2006). Metylace DNA bývá obvykle asociována s inaktivací genu a utichnutím exprese. Vzhledem k malému počtu vyšetřených případů nebylo v naší studii možné provést relevantní korelaci epigenetických změn a mutací genu *HNF1B* s expresí proteinu HNF-1β. Nicméně všechny čtyři případy endometroidního karcinomu děložního těla s metylovaným promotorem vykazovali negativitu nebo pouze slabou expresi proteinu HNF-1β, zatímco ve skupině, kde metylace detekována nebyla, jsme prokázali silnější míru exprese proteinu.

Navzdory vzrůstajícím znalostem o významu jednonukleotidových polymorfismů (SNP) genu *HNF1B* v některých typech nádorů je o mutacích tohoto genu dosud známo poměrně málo, kromě germinálních mutací asociovaných s karcinomy ledvin (Rebouissou S. et al., 2005).

V naší studii jsme analyzovali genetické varianty v celém kódujícím regionu genu *HNF1B*, kde se nám ve skupině 30 endometroidních karcinomů děložního těla podařilo detekovat čtyři jednonukleotidové sekvenční varianty a mezi 12 světlobuněčnými karcinomy ovaria jednu missence variantu. V případě endometroidních karcinomů byla zachycena jedna nonsense mutace v exonu 2 c.454C>T (p.Gln152X) vedoucí ke zkrácenému proteinovému

produktu. V tomto zkráceném proteinovém produktu však zůstala zachována oblast epitopu, která byla detekovaná naší protilátkou, což může vysvětlit, proč došlo v tomto konkrétním případě s prokázanou mutací k zachování imunohistochemické exprese HNF-1 β . Dále se nám podařilo prokázat tři genové varianty nejasného významu: jednu silent variantu v exonu 3, c.585c>t (p.Asp195; pravděpodobně patogenní www.mutationtaster.org), která nevede v translatovaném proteinu ke změně smyslu aminokyseliny, nicméně by mohla ovlivňovat stabilitu proteinu, a dvě intronové varianty 25 nukleotidů před exonem 3, c.545-25C>T, a 27 nukleotidů za exonem 3, c.809+27C>T, které by mohly potenciálně vést k aberantnímu sestřihu mRNA a následně aberantnímu proteinovému produktu, ale jejich význam není dosud spolehlivě objasněn.

Ve skupině světlobuněčných karcinomů ovaria jsme detekovali u jednoho případu missense variantu v exonu 4 vedoucí ke změně aminokyseliny na pozici 283 z Alaninu na Valin (c.848C>T, p.Ala283Val). Tato varianta postihuje DNA vazebnou doménu (aminokyseliny 231-331), což pravděpodobně následně zásadním způsobem ovlivní funkci proteinu. Prediktivními modely *in silico* bylo potvrzeno, že jde vysoce pravděpodobně o mutaci patogenní.

Jako poslední jsme analyzovali skupinu APA. APA je vzácná děložní léze, která byla poprvé popsána 1981 jako benigní polypózní léze dělohy postihující většinou premenopauzální pacientky (Mazur MT., 1981). Bývá lokalizována v dolním děložním segmentu nebo horní části hrdla, ale může se objevit i kdekoli jinde v děložním těle (Obr. 9). APA je polypózní, mikroskopicky bifázická léze, tvořená epitelovou a mezenchymální komponentou. Epitelová komponenta sestává z architektonicky komplexních žlázek endometroidního typu, které vykazují mírný až střední stupeň jaderných atypií. Typickým znakem léze je tvorba skvamózních morul (Obr. 10). Mezenchymální komponenta je leiomyomatózní či fibromyomatózní. Na základě morfologie zvláště žlazové komponenty

mohou být někdy APA v malých vzorcích diagnosticky zaměněny za hyperplazii endometria bez atypií, atypickou hyperplazii endometria nebo endometroidní karcinom.

APA bývají většinou považovány za benigní léze, nicméně u konzervativně léčených pacientek, které podstoupí pouze kyretáž nebo polypektomii, dochází poměrně často k rekurenci/persistenci léze, která dosahuje dle některých studií až 45 % (Mazur MT., 1981; Chen B. et al., 2012; Longacre TA. et al., 1996; Matsumoto T. et al., 2013; Young RH. et al., 1986). Navíc bývají tyto léze nacházeny v souvislosti či předcházejí vzniku atypické hyperplazie nebo endometroidního karcinomu, a to až v 8,8 %. Toto potvrzuje řada studií včetně metaanalytické studie 136 případů z roku 2006 (Heatley MK., 2006; Fukunaga M. et al., 1995; Nejtkovic L. et al., 2013; Zhang HK. et al., 2012). Na základě těchto údajů, by se tedy na APA nemělo automaticky nahlížet jako na lézi benigní (Jiang QY. et al., 2013). Vzhledem k tomu, že řada pacientek s APA je v produktivním věku a často si přejí zachovat fertilitu, může být terapeutický postup v těchto případech problematický. V současné době neexistuje jednotný názor na přístup k pacientkám s APA. V tomto kontextu je tedy důležité pokusit se určit patogenezi a biologickou povahu léze.

Ačkoli bylo v literatuře popsáno přes 230 případů APA, jen 2 malé studie (6 a 7 případů) hodnotily pouze některé molekulární aspekty lézí a exprese HNF-1 β dosud v APA popsána nebyla vůbec (Ota S. et al., 2003; Takahashi H. et al., 2014). Pokusili jsme se tedy provést komplexní imunohistochemickou a molekulární analýzu těchto lézí se snahou o zhodnocení patogeneze a biologické povahy. Analyzovali jsme jednak proteiny a geny, u kterých je známá souvislost s vývojem atypické hyperplazie endometria a endometroidního karcinomu jako jsou například geny *KRAS*, *PTEN*, proteiny MSI, a také některé v této oblasti dosud méně prozkoumané proteiny jako například HNF-1 β , GLUT1 a mTOR (Byron SA. et al., 2012; Saegusa M. et al., 2004). Z významnějších nálezů se nám na imunohistochemické úrovni podařilo prokázat expresi HNF-1 β u 16/21 (76,2 %) vzorků, ztrátu exprese PTEN u

6/19 (31,6 %) vzorků a dále pozitivní expresi mTOR, GLUT1 a β -kateninu u většiny případů. Expres proteinů mikrosatelitní instability byla intaktní a domníváme se proto, že se mikrosatelitní instabilita nepodílí na vzniku APA a tato léze tedy není součástí Lynchova syndromu. P53, který je často mutován u karcinomů endometria II. typu, vykazoval imunohistochemicky „divoký typ“ exprese a ani při cytogenetické analýze numerických aberací genu *TP53* jsme neprokázali jeho delece či amplifikace. Expres HNF-1 β dosahovala v našem souboru vzorků o něco nižší positivity, než tomu bylo ve skupině výše uvedených atypických hyperplazií endometria, ale tato diskrepance by mohla být vysvětlena malým počtem vyšetřených vzorků.

Na molekulární úrovni jsme našli mutace genu *KRAS* u 5/19 (26,3 %) vzorků, a deleci *PTEN* u 4/21 (19,05 %) vzorků. Mutace *KRAS* bývají popisovány až u 20 % endometroidních karcinomů a v některých případech atypické hyperplazie (Dobrzycka B. et al., 2009; Liu FS., 2007). Ve většině endometroidních karcinomů můžeme nalézt alteraci imunohistochemické exprese PTEN, buď redukci či úplnou absenci barvení. Mutace nebo ztráta exprese PTEN na imunohistochemické úrovni jsou považované za časně markery endometriální karcinogeneze. Vzhledem k tomu, že dle provedených a literárně uveřejněných předchozích studií byly změny PTEN zastiženy i v prekursorových lézích, předpokládalo se, že by mohly být využity jako biomarker schopný identifikovat léze, které budou s větší pravděpodobností progredovat v karcinom (Mutter GL. et al., 2000). Nicméně autoři recentnějších studie našli ztrátu exprese PTEN nejen v lézích, které progredovaly v karcinom, ale v obdobném procentu i v lézích, z nichž karcinom nevznikl, a z tohoto důvodu nelze PTEN považovat za vhodný marker progresu (Lacey JV Jr. et al., 2008). Mimo to byla ztráta exprese PTEN zaznamenána i v normálním endometriu, v sekreční i proliferační fázi cyklu (Mutter GL. et al., 2000). Navíc je dobře známá relativně špatná korelace mezi ztrátou exprese PTEN proteinu a přítomností mutace genu, což by mohlo souviset s výskytem

epigenetických změn sekvenováním nedetekovaných (Djordjevic B. et al., 2012). V naší studii jsme prokázali ztrátu exprese PTEN u 6/19, v jednom vzorku doprovázenou delecí *PTEN* a delecí *PTEN* u dalších tří vzorků bez doprovodné ztráty exprese PTEN. Diskrepance mezi imunohistochemickým a molekulárním nálezem v případě PTEN by mohla být vysvětlena faktem, že delece *PTEN* doprovázená ztrátou exprese proteinu postihuje pouze některé žlázy. V některých pracech bylo popsáno, že PTEN fosforyláza je negativním regulátorem mTOR a endometroidní karcinomy jsou často asociovány se zvýšením signalizace mTOR (Cheng H. et al., 2014; Ocana A. et al., 2014). V dalších vyšetřovaných genech nebyly mutace v rozsahu studie zastiženy, ačkoli například mutace genu *BRAF* může být nacházena až u 20 % endometroidních karcinomů (Feng YZ. et al., 2005). V naší studii jsme tedy prokázali, že APA vykazuje konzistentní imunohistochemické a molekulární znaky, zejména expresi HNF-1 β , fosforylovaného mTOR, GLUT1 a β -kateninu a „divoký“ typ exprese p53 proteinu. Dále v některých případech ztrátu exprese PTEN a mutace *KRAS*. Tedy obdobné znaky, s jakými se setkáváme u atypické hyperplazie a endometroidního karcinomu. Podrobnější přehled imunohistochemických a molekulárních nálezů je uveden v tabulce 5 a 6.

6. ZÁVĚR

HNF-1 β je transkripční faktor, který byl dosud v oblasti ženského genitálu podrobněji prozkoumaný jen v některých lézích, zejména v ovariálních karcinomech, u kterých je považovaný za vysoce senzitivní a specifický marker světlobuněčných karcinomů. Nicméně v řadě recentnějších prací včetně našich byla popsána jeho exprese i v jiných typech karcinomů ženského genitálu. V některých oblastech ženského genitálu naopak nebyla exprese tohoto markeru důkladněji zkoumána a na tyto oblasti jsme zaměřili svou pozornost.

V oblasti děložního hrdla jsme na základě našich výsledků prokázali, že exprese HNF-1 β je převážně omezena na adenokarcinomy, zatímco v dlaždicobuněčných karcinomech byla nalezena pouze zcela raritně. Domníváme se proto, že HNF-1 β by mohl být potenciálně využitelný jako pomocný marker v diferenciální diagnostice málo diferencovaných adenokarcinomů a dlaždicobuněčných karcinomů děložního hrdla, jejichž odlišení je na morfologické úrovni někdy obtížné až nemožné, nicméně z klinického hlediska s ohledem na následnou terapii významné. Samotnou expresi tohoto markeru však nelze nadřadit nad jiné rutinně používané markery užívané k diferenciální diagnostice těchto morfologicky obtížně zařaditelných karcinomů. Naše výsledky ukazují, že by HNF-1 β mohl být považovaný za marker adenokarcinomů děložního hrdla, zatímco p63, p40 a D2-40 jsou vysoce specifické markery dlaždicobuněčných karcinomů ovšem s variabilní mírou senzitivity. Nicméně HNF-1 β nelze použít samostatně, optimálních výsledků při diferenciální diagnostice by mohlo být dosaženo užitím kombinace výše uvedených protilátek v diagnostickém panelu. Přehled protilátek, které by mohly být využitelné v diferenciální diagnostice adenokarcinomů a dlaždicobuněčných karcinomů děložního hrdla je uveden v tabulce 3.

Využití HNF-1 β v diferenciální diagnostice v oblasti děložního čípku má však jisté limitace. Vzhledem k tomu, že jsme v naší studii prokázali expresi této protilátky nejen ve strukturách invazivního adenokarcinomu, ale i v nenádorových endocervikálních žlázkách, nelze tento marker využít v diferenciální diagnostice benigních lézí čípku a dobře diferencovaných endocervikálních adenokarcinomů, které mohou být p16 negativní, a jejichž diagnostika je velmi obtížná.

Protože jsme prokázali různou míru exprese HNF-1 β nejen v adenokarcinomech děložního hrdla, ale i v endometroidních a vzácněji i dalších typech adenokarcinomů děložního těla, neukázal se tento marker vhodný ani v diferenciální diagnostice mezi nádory pocházejícími z těchto dvou lokalit.

V oblasti děložního těla jsme provedli komplexní imunohistochemickou analýzu HNF-1 β v normálním endometriu v různé fázi děložního cyklu, v různých typech endometriálních lézí a karcinomů, spolu s kontrolní skupinou světlobuněčných karcinomů ovaria. V souladu s recentními studiemi jsme prokázali, že HNF-1 β je senzitivní marker pro světlobuněčné karcinomy ovaria i endometria, který lze použít k diferenciální diagnostice nádoru ženského genitálu, nicméně musíme si být vědomi některých limitů, zejména jeho ne příliš vysoké specifity pro světlobuněčné karcinomy děložního těla. Pozitivní exprese HNF-1 β může být totiž běžně nalezena i v jiných typech nádorů a dokonce i v nenádorových lézích ženského genitálu. Nicméně silnou intenzitu exprese HNF-1 β jsme prokázali pouze ve skupině světlobuněčných karcinomů ovaria i endometria, kromě jednoho případu serózního karcinomu endometria. Kromě toho jsme zaznamenali různou míru exprese HNF-1 β v endometroidních karcinomech v závislosti na stupni diferenciaci nádoru. Nízce diferencované endometroidní karcinomy vykazovaly ve srovnání s karcinomy dobře či středně dobře diferencovanými pozitivitu pouze vzácně.

Z našich výsledků vyplývá, že HNF-1 β může být využit v diferenciální diagnostice nádorů ženského genitálu, ale musíme si být vědomi určitých limitací, zejména nízké specifity markeru pro světlobuněčné karcinomy. Pokud však při interpretaci zohledníme intenzitu exprese, specifita vyšetření se výrazně zvyšuje

V další části studie jsme provedli analýzu epigenetických a genetických změn genu *HNF1B* (kódujícího protein HNF-1 β) v endometroidních karcinomech děložního těla, ve vzorcích nenádorové tkáně a v ovariálních světlobuněčných karcinomech. Pro tuto analýzu jsme použili bisulfitové a přímé Sangerovo sekvenování. U části endometroidních karcinomů (13 %) se nám podařilo prokázat metylaci promotoru, která byla převážně asociována s negativitou či slabou expresí proteinu HNF-1 β , oproti tomu v žádném vzorku ze skupiny světlobuněčných karcinomů ovaria metylace promotoru zastižena nebyla.

Při vyšetření kódujících sekvencí genu *HNF1B* jsme ve skupině endometroidních karcinomů našli jednu patogenní nonsense heterozygotní mutaci a další tři jednonukleotidové varianty (jedna silent variant a dvě intronové varianty), které by mohly potenciálně vést k aberantnímu sestřihu mRNA a následně aberantnímu proteinovému produktu, ale jejich přesný význam je dosud nejasný.

Ve skupině světlobuněčných karcinomů ovaria jsme prokázali jednu missense variantu. Nicméně v případě vyšetření genetických a epigenetických změn genu *HNF1B* a jejich korelací s expresí proteinu jsme si vědomi limitací vyplývajících z malého souboru případů. Přesná role HNF1B v karcinogenezi s tím související možné využití HNF-1 β proteinu při cílené terapii nádorů zůstává dosud neobjasněna a bude si vyžadovat další výzkum.

Při analýze atypických polypózních adenomyomů se nám na imunohistochemické i molekulárně genetické úrovni podařilo prokázat, že tyto léze sdílejí některé společné imunohistochemické a molekulární znaky s atypickou hyperplazií endometria a

endometroidními karcinomy děložního těla. Na základě našich výsledků, které jsou v souladu s dříve publikovanými klinickými a morfologickými daty, se domníváme, že by atypické polypózní adenomyomy měly být považovány za lokalizovanou formu atypické hyperplazie endometria a tedy prekursor endometroidního karcinomu. Tento závěr je klinicky významný zejména s ohledem na fakt, že léze se často vyskytuje u mladých žen a dívek přejících si zachování fertility.

V naší práci se nám podařilo splnit všechny navržené cíle, prokázali jsme, že HNF-1 β má při diagnostice lézí a nádorů ženského genitálu nezastupitelnou roli, podařilo se nám nalézt několik genetických variací genu *HNF1B*, které by mohly eventuálně hrát v budoucnu roli při využití HNF-1 β proteinu při cílené terapii nádorů.

7. SUMMARY

In our study, we focused on comprehensive analysis of HNF-1-beta expression in various types of lesions, normal tissues and tumours of the female genital tract. Moreover, we analyzed genetic variations of the *HNF1B* coding region and methylation of the promoter region in selected cases of endometrioid carcinoma, ovarian clear cell carcinoma and non-neoplastic tissues.

In cervical region, we found that expression of HNF-1 β is mostly restricted to invasive cervical adenocarcinomas, and can be used as an auxiliary adenocarcinoma marker in the differential diagnosis of poorly differentiated cervical carcinomas. This is important finding because distinguishing between poorly differentiated adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix can be difficult and in some cases is almost impossible based only on histological features. But this distinction can modify therapeutic decisions. According to our results, HNF-1 β can be considered as an adenocarcinoma marker, while p63/p40 and D2-40 are highly specific squamous cell carcinoma markers with variable sensitivity. Optimal results can be achieved by using these markers in a panel. We should be aware of some limitations of the utility of HNF-1 β in this region because of expression of HNF-1 β in benign glands. This preclude use of this marker in the differential diagnosis of benign lesions and well differentiated types of cervical adenocarcinoma, which can be on rare occasions p16 negative. We also found the positivity of HNF-1 β in a subset of endometrioid and rarely some other types of endometrial adenocarcinomas, which prevents the use of this marker in the differential diagnosis between endometrioid and endocervical type of adenocarcinoma.

We confirmed that HNF-1 β is a relatively sensitive marker of clear cell carcinoma of ovary and endometrium, but its specificity is lower than previously thought. Our

immunohistochemical analysis of HNF-1 β revealed that this protein can be expressed in various extents in all types of endometrial lesions, normal endometrium and endometrial tumours. Nevertheless, if we consider the character of staining, strong expression of HNF-1 β was mostly limited to clear cell carcinomas, with one exception of endometrial serous carcinoma. The results of our study are in concordance with other recent studies. Moreover, we observed different HNF-1 β expression in endometrioid endometrial carcinomas depending on degree of tumor differentiation. The poorly differentiated endometrioid carcinomas seldom express HNF-1 β comparing with well or moderately differentiated tumours.

Further, molecular analysis revealed relatively common (13.3%) methylation of the *HNF1B* promotor in endometrial endometrioid carcinoma comparing to the unmethylated *HNF1B* promotor in clear cell carcinomas of ovary. DNA methylation is typically associated with the silencing of the gene expression. In our study, it was not possible to correlate *HNF1B* genetic and epigenetic variations with expression pattern of HNF-1 β because of a small sample set. Nevertheless, we observed in all four cases with methylated promoter weak or negative HNF-1 β staining, while stronger expression was detected in the tumor group with unmethylated promoter.

We also found nonsense heterozygous mutations of *HNF1B* in one case of endometrial endometrioid carcinoma, leading to premature translation termination resulting in the aberrant protein formation. This truncated protein, however, retained epitope detected by our antibody which can explain immunohistochemical detection of HNF-1 β expression in this case.

Four other single nucleotide variants were identified, three of them in endometrioid carcinomas (one silent variant in exon 3, and two noncoding variants in intron 2 and intron 3) and one in clear cell carcinoma of ovary (missense variant in exon 4). This variant affects DNA binding domain (amino acids 231-311) which suggests that this variant affects crucial function of the protein. High probability of damaging effect of this mutation was suggested

also by *in silico* predictive model. However, regarding genetic and epigenetic changes, we are well aware of the limitations of our study because of small cohort of cases.

Finally, we performed a comprehensive immunohistochemical and molecular analysis of atypical polypoid adenomyomas, uncommon uterine lesion that commonly recur after local excision and are occasionally associated with or precede the development of atypical endometrial hyperplasia or endometrioid adenocarcinoma. Because of the fact that many patients with atypical polypoid adenomyoma are in the reproductive age group, a request for fertility sparing management is common. In this context, it was very important to determine the molecular events associated with the pathogenesis of this lesion and related to its biological potential.

In summary, we have found that atypical polypoid adenomyomas exhibit consistent immunohistochemical and molecular features, especially the nuclear expression of β -catenin in squamous morules, the expression of HNF-1 β , phosphorylated mTOR and Glut-1 in the glandular component, and “wild-type” p53 protein expression. Loss of PTEN expression and *KRAS* mutation also occurred in some cases. The loss of mismatch-repair proteins expression was not found in any case. Therefore, microsatellite instability is unlikely to occurs in the development of atypical polypoid adenomyoma, and this lesion is not likely to be a component of Lynch syndrome. These immunophenotype and molecular events are similar to those found in atypical endometrial hyperplasia and endometrioid carcinoma. On the basis of our results, and in agreement with previously published clinical and morphologic data, we believe that atypical polypoid adenomyoma represents a lesion with an increased risk of developing atypical hyperplasia and endometrioid carcinoma. Given the association with atypical hyperplasia and endometrioid carcinoma and the shared immunohistochemical and molecular features, we suppose that, conceptually, atypical polypoid adenomyoma is best regarded as analogous to a localized form of atypical hyperplasia.

In summary, immunohistochemical analysis of HNF-1-beta expression can be of use in the differential diagnosis of various tumours of female genital tract, but we should be aware of some limitations, especially its low specificity for clear cell carcinomas.

The precise role of *HNF1B* gene in carcinogenesis as well as the importance of molecular targeting of the HNF-1 β protein for therapeutic purposes remain unknown and require additional studies.

8. LITERATURA

- Bach I, Yaniv M. More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J*. 1993 Nov;12(11):4229-42. Erratum in: *EMBO J* 1994 Jan 15;13(2):492.
- Bárcena C, Oliva E. WT1 expression in the female genital tract. *Adv Anat Pathol*. 2011;18:454–65.
- Barbacci E, Chalkiadaki A, Masdeu C, Haumaitre C, Lokmane L, Loirat C, Cloarec S, Talianidis I, Bellanne-Chantelot C, Cereghini S. HNF1 β /TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum Mol Genet*. 2004;13(24):3139-49.
- Bellanné-Chantelot C, Chauveau D, Gautier JF, Dubois-Laforgue D, Clauin S, Beaufile S, Wilhelm JM, Boitard C, Noël LH, Velho G, Timsit J. Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1 β mutations. *Ann Intern Med*. 2004;140(7):510-7.
- Blumenfeld M., Maury M., Chouard T., Yaniv M. and Condamine H. Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development*. 1991 Oct;113(2):589-99.
- Buchner A, Castro M, Hennig A, Popp T, Assmann G, Stief CG, Zimmermann. Downregulation of HNF-1B in renal cell carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis. *Urology*. 2010;76:507.
doi:10.1016/j.urology.2010.03.042.
- Byron SA, Gartside M, Powell MA, Wellens CL, Gao F, Mutch DG, Goodfellow PJ, Pollock PM. FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features. *PLoS One*. 2012;7:e30801.

- Cereghini S, Ott MO, Power S, Maury M. Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Development*. 1992;116(3):783-97.
- Cereghini S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J*. 1996;10(2):267-82.
- Chuang WY, Yeh CJ, Wu YC, Chao YK, Liu YH, Tseng CK, Chang HK, Liu HP, Hsueh C. Tumor cell expression of podoplanin correlates with nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*. 2009;24:1021–7.
- Chen B, Zhu L, Lang JH. Atypical polypoid adenomyoma of the uterus: an analysis of 17 cases [In Chinese]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2012;92:1049–1051.
- Cheng H, Liu P, Zhang F, Xu E, Symonds L, Ohlson CE, Bronson RT, Maira SM, Di Tomaso E, Li J, Myers AP, Cantley LC, Mills GB, Zhao JJ. A genetic mouse model of invasive endometrial cancer driven by concurrent loss of Pten and Lkb1 is highly responsive to mTOR inhibition. *Cancer Res*. 2014;74:15–23.
- De Simone V, De Magistris L, Lazzaro D, Gerstner J, Monaci P, Nicosia A, Cortese R. LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J*. 1991;10(6):1435-43.
- Djordjevic B, Hennessy BT, Li J, Barkoh BA, Luthra R, Mills GB, Broaddus RR. Clinical assessment of PTEN loss in endometrial carcinoma: immunohistochemistry outperforms gene sequencing. *Mod Pathol*. 2012;25:699–708.
- Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Mazurek A, Kowalczyk O, Niklińska W, Chyczewski L, Kulikowski M. Mutations of the KRAS oncogene in endometrial hyperplasia and carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47:65–68.

- Dumoff KL, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang PJ, Acs G. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol*. 2005;18:97–104.
- Fadare O, Liang SX. Diagnostic Utility of Hepatocyte Nuclear Factor 1-Beta Immunoreactivity in Endometrial Carcinomas: Lack of Specificity For Endometrial Clear Cell Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012 Dec;20(6):580-7.
- Fadare O, Zhao C, Khabele D, Parkash V, Quick CM, Gwin K, Desouki MM. Comparative analysis of Napsin A, alpha-methylacyl-coenzyme A racemase (AMACR, P504S), and hepatocyte nuclear factor 1 beta as diagnostic markers of ovarian clear cell carcinoma: an immunohistochemical study of 279 ovarian tumours. *Pathology*. 2015 Feb;47(2):105-11.
- Feng YZ, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, Konishi I. BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. *Clin Cancer Res*. 2005;11:6133–6138.
- Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A, Teague JW, Campbell PJ, Stratton MR, Futreal PA. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D945-50. doi: 10.1093/nar/gkq929. Epub 2010 Oct 15.
- Fukunaga M, Endo Y, Ushigome S, Ishikawa E. Atypical polypoid adenomyomas of the uterus. *Histopathology*. 1995;27:35–42.
- Goff BA, Sainz de la Cuesta R, Muntz HG, Fleischhacker D, Ek M, Rice LW, Nikrui N, Tamimi HK, Cain JM, Greer BE, Fuller AF Jr. Clear cell carcinoma of the ovary: a

- distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy in stage III disease. *Gynecol Oncol* 1996;60:412–417.
- Harries LW, Perry JR, McCullagh P, Crundwell M. Alterations in LMTK2, MSMB and HNF1B gene expression are associated with the development of prostate cancer. *BMC Cancer* 2010;10:315. doi: 10.1186/1471-2407-10-315.
- Haumaitre C, Reber M, Cereghini S. Functions of HNF1 family members in differentiation of the visceral endoderm cell lineage. *J Biol Chem*. 2003;278(42):40933-42.
- Heatley MK. Atypical polypoid adenomyoma: a systematic review of the English literature. *Histopathology*. 2006;48:609–610.
- Hoang LN, Han G, McConechy M, Lau S, Chow C, Gilks CB, Huntsman DG, Köbel M, Lee CH. Immunohistochemical characterization of prototypical endometrial clear cell carcinoma--diagnostic utility of HNF-1 β and oestrogen receptor. *Histopathology*. 2014 Mar;64(4):585-96.
- Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B. N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., Kuroki, H., Kasahara, T., Iwamoto, Y., Bell, G. I. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1-beta gene (TCF2) associated with MODY. (Letter) *Nature Genet*.1997;17: 384-385.
- Hu YL, Zhong D, Pang F, Ning QY, Zhang YY, Li G, Wu JZ, Mo ZN. HNF1b is involved in prostate cancer risk via modulating androgenic hormone effects and coordination with other genes. *Genet Mol Res*. 2013 Apr 25;12(2):1327-35.
- Huang W, Cheng X, Ji J, Zhang J, Li Q. The Application Value of HNF-1 β Transcription Factor in the Diagnosis of Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2016 Jan;35(1):66-71.
- Jiang QY, Wang L, Wu RJ. A multiple perspectives on atypical polypoid adenomyoma of uterus. *Gynecol Endocrinol*. 2013;29:623–625.

- Kalloger SE, Köbel M, Leung S, Mehl E, Gao D, Marcon KM, Chow C, Clarke BA, Huntsman DG, Gilks CB. Calculator for ovarian carcinoma subtype prediction. *Mod Pathol.* 2011; 24(4):512-21.
- Kato N, Sasou S, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol.* 2006;19(1):83-9.
- Kato N, Tamura G, Motoyama T. Hypomethylation of hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) CpG island in clear cell carcinoma of the ovary. *Virchows Arch.* 2008;452(2):175-80.
- Kato N, Motoyama T. Hepatocyte nuclear factor-1beta(HNF-1beta) in human urogenital organs: its expression and role in embryogenesis and tumorigenesis. *Histol Histopathol.* 2009 Nov;24(11):1479-86.
- Kenny SL, McBride HA, Jamison J, McCluggage WG. Mesonephric adenocarcinomas of the uterine cervix and corpus: HPV-negative neoplasms that are commonly PAX8, CA125, and HMGA2 positive and that may be immunoreactive with TTF1 and hepatocyte nuclear factor 1- β *Am J Surg Pathol.* 2012;36:799–807.
- Kim L, Liao J, Zhang M, Talamonti M, Bentrem D, Rao S, Yang GY. Clear cell carcinoma of the pancreas: histopathologic features and a unique biomarker: hepatocyte nuclear factor-1beta. *Mod Pathol.* 2008;21:1075–83.
- Kobayashi H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sakata M, Sado T, Oi H. The role of hepatocyte nuclear factor-1beta in the pathogenesis of clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer.* 2009 Apr;19(3):471-9.
- Köbel M, Reuss A, Bois Ad, Kommoss S, Kommoss F, Gao D, Kalloger SE, Huntsman DG, Gilks CB. The biological and clinical value of p53 expression in pelvic high-grade serous carcinomas. *J Pathol.* 2010;222:191–198.
- Lacey JV Jr, Mutter GL, Ronnett BM, Ioffe OB, Duggan MA, Rush BB, Glass AG, Richesson DA, Chatterjee N, Langholz B, Sherman ME. PTEN expression in

- endometrial biopsies as a marker of progression to endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 2008;68:6014–6020.
- Lazzaro D, De Simone V, De Magistris L, Lehtonen E, Cortese R. LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. *Development.* 1992 Feb;114(2):469-79.
- Lim D, Ip PP, Cheung AN, Kiyokawa T, Oliva E. Immunohistochemical Comparison of Ovarian and Uterine Endometrioid Carcinoma, Endometrioid Carcinoma With Clear Cell Change, and Clear Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2015 Apr 10.
- Liu FS. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2007;46:26–32.
- Lokmane L, Haumaitre C, Garcia-Villalba P, Anselme I, Schneider-Maunoury S, Cereghini S. Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development.* 2008;135(16):2777-86.
- Longacre TA, Chung MH, Rouse RV, Hendrickson MR. Atypical polypoid adenomyofibromas (atypical polypoid adenomyomas) of the uterus. A clinicopathologic study of 55 cases. *Am J Surg Pathol.* 1996;20:1–20.
- Mandato VD, Farnetti E, Torricelli F, Abrate M, Casali B, Ciarlini G, Pirillo D, Gelli MC, Nicoli D, Grassi M, LA Sala GB, Palomba S. HNF1B polymorphism influence the prognosis of endometrial cancer patients: a cohort study. *BMC Cancer.* 2015 Apr 7;15(1):229.
- Matsumoto T, Hiura M, Baba T, Ishiko O, Shiozawa T, Yaegashi N, Kobayashi H, Yoshikawa H, Kawamura N, Kaku T. Clinical management of atypical polypoid adenomyoma of the uterus. A clinicopathological review of 29 cases. *Gynecol Oncol.* 2013;129:54–57.

- Mazur MT. Atypical polypoid adenomyomas of the endometrium. *Am J Surg Pathol*. 1981;5:473–482.
- McCluggage WG, Soslow RA, Gilks CB. Patterns of p53 immunoreactivity in endometrial carcinomas: “all or nothing” staining is of importance. *Histopathology*. 2011;59:786–788.
- Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:924–930.
- Noto H, Osame K, Sasazuki T, Noda M Substantially increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic evidence in Japan. *J Diabetes Complications*. 2010 Sep-Oct;24(5):345-53.
- Nejkovic L, Pazin V, Filimonovic D. Atypical polypoid adenomyoma mixed with endometrioid carcinoma: a case report. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2013;34:101–103.
- Ocana A, Vera-Badillo F, Al-Mubarak M, Templeton AJ, Corrales-Sanchez V, Diez-Gonzalez L, Cuenca-Lopez MD, Seruga B3, Pandiella A, Amir E. Activation of the PI3K/mTOR/AKT pathway and survival in solid tumors: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9:e95219.
- Ota S, Catusus L, Matias-Guiu X, Bussaglia E, Lagarda H, Pons C, Muñoz J, Kamura T, Prat J. Molecular pathology of atypical polypoid adenomyoma of the uterus. *Hum Pathol*. 2003;34: 784–788.
- Ott MO, Rey-Campos J, Cereghini S, Yaniv M. vHNF1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes HNF1 expression. *Mech Dev*. 1991 Dec;36(1-2):47-58.

- Painter JN, O'Mara TA, Batra J, Cheng T, Lose FA, Dennis J, Michailidou K, et al. Fine-mapping of the HNF1B multicancer locus identifies candidate variants that mediate endometrial cancer risk. *Hum Mol Genet.* 2015 Mar 1;24(5):1478-92.
- Park KJ, Kiyokawa T, Soslow RA, Lamb CA, Oliva E, Zivanovic O, Juretzka MM, Pirog EC. Unusual Endocervical Adenocarcinomas: An Immunohistochemical Analysis With Molecular Detection of Human Papillomavirus. *Am J Surg Pathol.* 2011; 35(5): 633–646.
- Pharoah, P.D., Tsai, Y.Y., Ramus, S.J., Phelan, C.M., Goode, E.L., Lawrenson, K., Buckley, M., Fridley, B.L., Tyrer, J.P., Shen, H. et al. (2013) GWAS meta-analysis and replication identifies three new susceptibility loci for ovarian cancer. *Nat. Genet.*, 45, 362–370. 370e361-362.
- Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, Yaniv M. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell.* 1996 Feb 23;84(4):575-85.
- Pontoglio M. Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 2000, 11(Suppl 16):S140-S143.
- Rebouissou S, Vasiliu V, Thomas C, Bellanné-Chantelot C, Bui H, Chrétien Y, Timsit J, Rosty C, Laurent-Puig P, Chauveau D, Zucman-Rossi J. Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas. *Hum Mol Genet.* 2005 Mar 1;14(5):603-14.
- Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Hamano M, Okayasu I. Beta-catenin simultaneously induces activation of the p53-p21WAF1 pathway and overexpression of cyclin D1 during squamous differentiation of endometrial carcinoma cells. *Am J Pathol.* 2004;164:1739–1749.

- Shao DD, Tsherniak A, Gopal S, Weir BA, Tamayo P, Stransky N, Schumacher SE, Zack TI, Beroukhi R, Garraway LA, Margolin AA, Root DE, Hahn WC, Mesirov JP. ATARIS: computational quantification of gene suppression phenotypes from multi-sample RNAi screens. *Genome Res.* 2013 Apr;23(4):665-78.
- Shen K, Yueng W, Ngan H. Estrogen and progesterone receptors in normal cervix and primary cervical carcinoma. *Chin Med J (Engl).* 1994;107:648–52.
- Shen, H., Fridley, B.L., Song, H., Lawrenson, K., Cunningham, J.M., Ramus, S.J., Cicek, M.S., Tyrer, J., Stram, D., Larson, M.C. et al. Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer. *Nat. Commun.* 2013; 4,1628.
- Spurdle AB, Thompson DJ, Ahmed S, Ferguson K, Healey CS, O'Mara T, Walker LC, Montgomery SB, Dermitzakis ET et al. Genome-wide association study identifies a common variant associated with risk of endometrial cancer. *Nat Genet.* 2011 May;43(5):451-4.
- Suzuki E, Kajita S, Takahashi H, Matsumoto T, Tsuruta T, Saegusa M. Transcriptional upregulation of HNF-1 β by NF- κ B in ovarian clear cell carcinoma modulates susceptibility to apoptosis through alteration in bcl-2 expression. *Lab Invest* 2015; 95:962-72.
- Takahashi H, Yoshida T, Matsumoto T, Kameda Y, Takano Y, Tazo Y, Inoue H, Saegusa M. Frequent betacatenin gene mutations in atypical polypoid adenomyoma of the uterus. *Hum Pathol.* 2014;45:33–40.
- Terasawa K, Toyota M, Sagae S, Ogi K, Suzuki H, Sonoda T, Akino K, Maruyama R, Nishikawa N, Imai K, Shinomura Y, Saito T, Tokino T. Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines. *Br J Cancer.* 2006;94:914–21.

- Toki T, Yajima A. Immunohistochemical localization of carcinoembryonic antigen (CEA) in squamous cell carcinoma of the uterine cervix: prognostic significance of localization pattern of CEA. *Tohoku J Exp Med.* 1991;165:25–32.
- Tomassetti A, De Santis G, Castellano G, Miotti S, Mazzi M, Tomasoni D, Van Roy F, Carcangiu ML, Canevari S. Variant HNF1 modulates epithelial plasticity of normal and transformed ovary cells. *Neoplasia.* 2008; 10(12):1481-92.
- Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, Ohki M, Yasugi T, Taketani Y, Hirohashi S. Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 β as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2003;163(6):2503-12.
- Yamamoto S, Tsuda H, Aida S, Shimazaki H, Tamai S, Matsubara O. Immunohistochemical detection of hepatocyte nuclear factor 1 β in ovarian and endometrial clear-cell adenocarcinomas and nonneoplastic endometrium. *Hum Pathol.* 2007;38(7):1074-80.
- Young RH, Treger T, Scully RE. Atypical polypoid adenomyoma of the uterus. A report of 27 cases. *Am J Clin Pathol.* 1986;86:139–145.
- Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, et al. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer.* 2006;107:563–9.
- Wang W, Hayashi Y, Ninomiya T, Ohta K, Nakabayashi H, Tamaoki T, Itoh H. Expression of HNF-1 α and HNF-1 β in various histological differentiations of hepatocellular carcinoma. *J Pathol.* 1998 Mar; 184(3):272-8.
- Zhang HK, Chen WD. Atypical polypoid adenomyomas progressed to endometrial endometrioid adenocarcinomas. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;286:707–710.

9. PŘÍLOHY

Tabulka 1. Páry primerů pro metylační a mutační analýzy genu HNF1B.

Exon	Název	Primery 5'→3'	bp	Amplicon[bp]
Primery pro metylační analýzu				
	HNF1B_mp2F	TTAGGTTGTAAGGTATTGGTTTAATAA GTTTAAAGG	36	160
	HNF1B_mp2R	AAACAAACCTAAAAAACAAAAACCT AAACC	31	
Primery pro mutační analýzu kódující oblasti				
1	HNF1B_01f	TGCTTGTGAACTCCCCTCCAC	22	277
	HNF1B_02r	TGGTGAGAGTATGGAAGACCGGC	23	
1	HNF1B_03f	TTGCTGCCATCCCCGAAGTTC	21	274
	HNF1B_04r	TCCCCTCCACCTCGCTCTG	19	
2	HNF1B_05f	CCCCAGATGTCTCCCACTAGTACC	24	287
	HNF1B_06r	CACTTCAGGTTGAGGCAGAGGC	22	
3	HNF1B_07f	GGTGTCTTCGTCCGTTGTCTGTC	23	258
	HNF1B_08r	ATTTGAACCGGTTGCGGCG	19	
3	HNF1B_09f	GTCAACAGAGCCATGGGCCTG	21	234
	HNF1B_10r	TCCTGGGTCTGTGTACTTGCCC	22	
4	HNF1B_11f	CTGCTGTGATTGTGTGTTTTTGGCC	25	245
	HNF1B_12r	AGTCTGGTTGGAGCTATAGGCGTC	24	
4	HNF1B_13f	TGCAAACCGCAGGAAGGAGG	22	270
	HNF1B_14r	GAGAGCGGCCCTAGGATCATCTC	23	
5	HNF1B_15f	CAGGACCCTGGTGGCACTAATG	22	246
	HNF1B_16r	AGCTCCAGAGCGACAATGGC	20	
6	HNF1B_17f	GGAAACTGCTCTTTGTGGTCCAAGTC	26	241
	HNF1B_18r	TCTTCTTCTCCCTGCCCCCAAG	22	
7	HNF1B_19f	CTCCTTATCCCAGGAGCTGTCTGTG	25	290
	HNF1B_20r	ACTGAGGGTCCTGAGTGCTCC	21	
8	HNF1B_21f	GCCTGTGTATGCACCTTGATTCTG	24	226
	HNF1B_22r	CACATCCATGGCCTTATCACACCC	24	
9	HNF1B_23f	AATGACACAGCTGAGCACCCCTC	22	172
	HNF1B_24r	CTCGCAGGTGCTGGTCAGG	19	

Tabulka 2. Imunohistochemický náález v karcinomech děložního čípku.

		HNF-1 β		ER		PR		CEA		p16		p63		p40		D2-40	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
ACAs (56 cases)	total	42	14	9	47	5	51	48	8	56	0	4	52	2	54	0	56
	3+	27		2		3		31		52							
	2+	8		1		1		13		2		1		1			
	1+	7		6		1		4		2		3		1			
SCC (85 cases)	total	2	83	9	76	1	84	77	8	85	1	85	0	85	0	45	40
	3+	1		3				13		83		83		83		15	
	2+	1		2				15				2		2		15	
	1+			4		1		49		2						15	
Undifferentiated carcinomas (14 cases)	total	2	12	0	14	0	14	8	6	14	0	7	7	5	9	1	13
	3+	1						1		13		4		4			
	2+							2				1				1	
	1+	1						5		1		2		1			

Imunohistochemické výsledky HNF-1 β , estrogenových a progesteronových receptorů, CEA, p16, p63, p40 a D2-40 byly semikvantitativně hodnoceny na čtyřstupňové škále dle procenta pozitivita nádorových buněk: 0 = <5 %; 1 = 5-29 %; 2 = 30-59 %; 3 = >60 %.

Tabulka 3. Přehled protilátek, které by mohly být využitelné v diferenciální diagnostice adenokarcinomů a dlaždicobuněčných karcinomů děložního čípku.

	ACA	SCC
HNF-1β	++ (75%)	- (2%)
p63/p40	-+ (7% / 4%)	+++ (100%)
CEA	+++ (86%)	+++ (91%)
ER	+ (16%)	+ (11%)
PR	-+ (9%)	- (1%)
D2-40	- (0%)	++ (54%)

V závorkách je uvedeno procento pozitivy v našem souboru případů.

Tabulka 4. Shrnutí výsledku imunohistochemických vyšetření v karcinomech a lézích endometria a světlobuněčném karcinomu ovaria.

HNF1B	OCCC	CCCE	SC	EC			HPA	HP	HA	H	Normální endometrium		
				G1	G2	G3					Sek.	Pro.	Atr.
celkem	19	18	27	77	73	30	14	16	16	11	15	18	5
Positivní	18	15	7	25	24	2	13	16	14	10	15	16	4
3+	14	11	5	3	4	2	5	12	4	5	13	11	4
2+	4	2	0	7	7	0	5	4	2	3	1	4	0
1+	0	2	2	15	13	0	3	0	8	2	1	1	0
Negativní	1	3	20	52	49	28	1	0	2	1	0	2	1

OCCC = ovariální světlobuněčný karcinom, CCCE = endometriální světlobuněčný karcinom, SC = serózní karcinom endometria, EC = endometroidní karcinom endometria, HPA = hyperplastický polyp s atypii, HP = hyperplastický polyp bez atypií, HA = atypické hyperplastické endometrium, H = hyperplazie bez atypií, Sek. = sekreční endometrium, Pro. = proliferativní endometrium, Atr. = atrofické endometrium, G1 = dobře diferencovaný, G2 = středně diferencovaný, G3 = níže diferencovaný karcinom.

Tabulka 5. Imunohistochemické výsledky atypických polypózních adenomyomů.

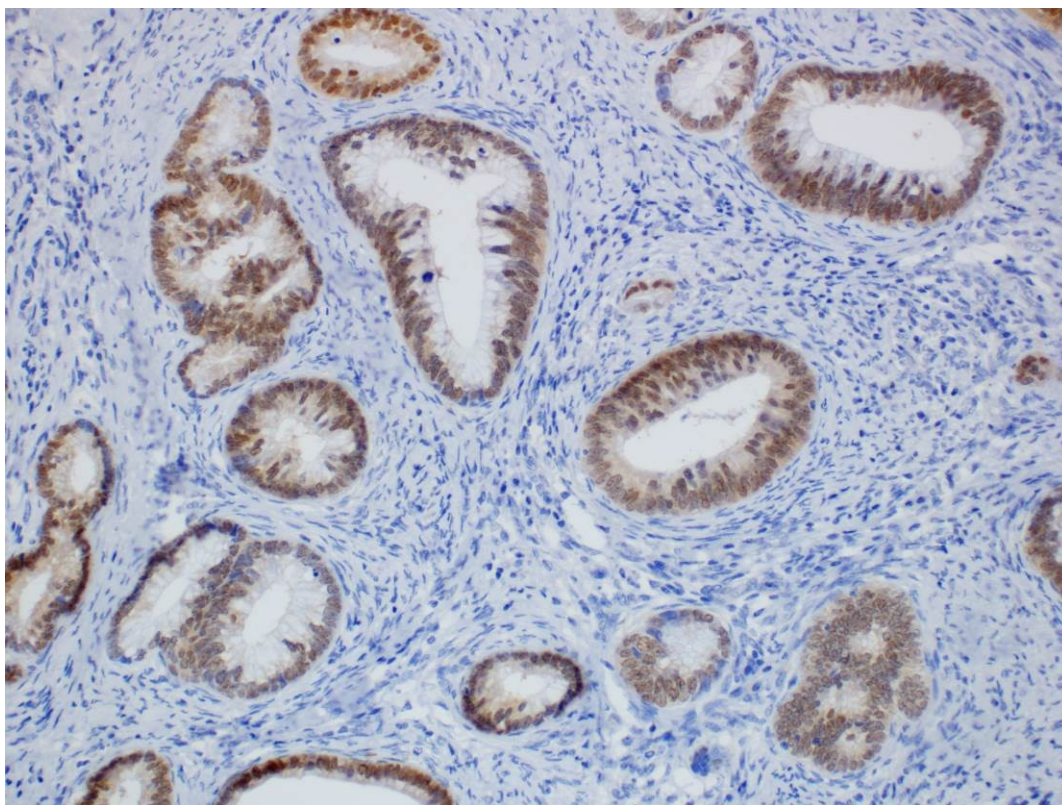
Patient	beta – catenin		M-TOR	PTEN	GLUT -1		HNF-1 -beta		p53	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2
No.	glands	morules			glands	morules	glands	morules					
1	1+	4+	N/A	3+	1+	1+	3+	0	wt	R	R	R	R
2	0	absent	2+	0	3+	absent	2+	absent	wt	R	R	R	R
3	1+	4+	4+	2+	3+	0%	3+	0	wt	R	R	R	R
4	1+	4+	4+	3+	2+	4+	3+	0	wt	R	R	R	R
	1+	4+	4+	3+	2+	2+	4+	0	wt	R	R	R	R
5	2+	0	3+	N/A	2+	0	0	0	wt	N/A	N/A	N/A	N/A
	1+	4+	4+	N/A	2+	0	4+	0	wt	R	R	R	R
6	1+	3+	2+	1+	3+	1+	3+	0	wt	N/A	N/A	N/A	R
	0	4+	3+	2+	3+	3+	4+	0	wt	R	R	R	R
7	1+	4+	0	2+	3+	0	3+	0	wt	R	R	R	R
8	0	0	1+	1+	1+	2+	0	0	wt	N/A	N/A	N/A	R
9	1+	4+	4+	0	2+	0	4+	0	wt	R	R	R	R
	0	3+	3+	0	2+	2+	4+	0	wt	R	R	R	R
10	1+	absent	4+	4+	4+	absent	3+	absent	wt	R	R	N/A	N/A
11	0	4+	3+	2+	2+	2+	2+	0	wt	R	R	N/A	N/A
12	0	0	2+	0	0	4+	0	0	wt	R	R	N/A	N/A
13	0	3+	3+	0	1+	2+	1+	0	wt	R	R	N/A	N/A
14	0	0	2+	0	3+	0	0	0	wt	R	R	N/A	N/A
15	1+	4+	0	3+	4+	absent	2+	absent	wt	R	R	N/A	N/A
16	3+	3+	4+	4+	2+	2+	0	0	wt	R	R	N/A	N/A
17	0	3+	N/A	3+	2+	2+	2+	0	wt	R	R	N/A	N/A

Expres HNF-1 β , β -kateninu, PTEN, mTOR a GLUT1 byla semikvantitativně hodnocena na pětistupňové škále dle procentuální pozitivity nádorových buněk: 0= \leq 5 %; 1+=5 % to 10 %; 2+=11-50 %; 3+=51-75 %; and 4+= >75 % nádorových buněk. N/A - nepoužitelné (málo materiálu pro analýzu nebo technické limity); N - normalní; wt - wild type = divoký typ; R – exprese zachována

Tabulka 6. Molekulární výsledky atypických polypózních adenomyomů.

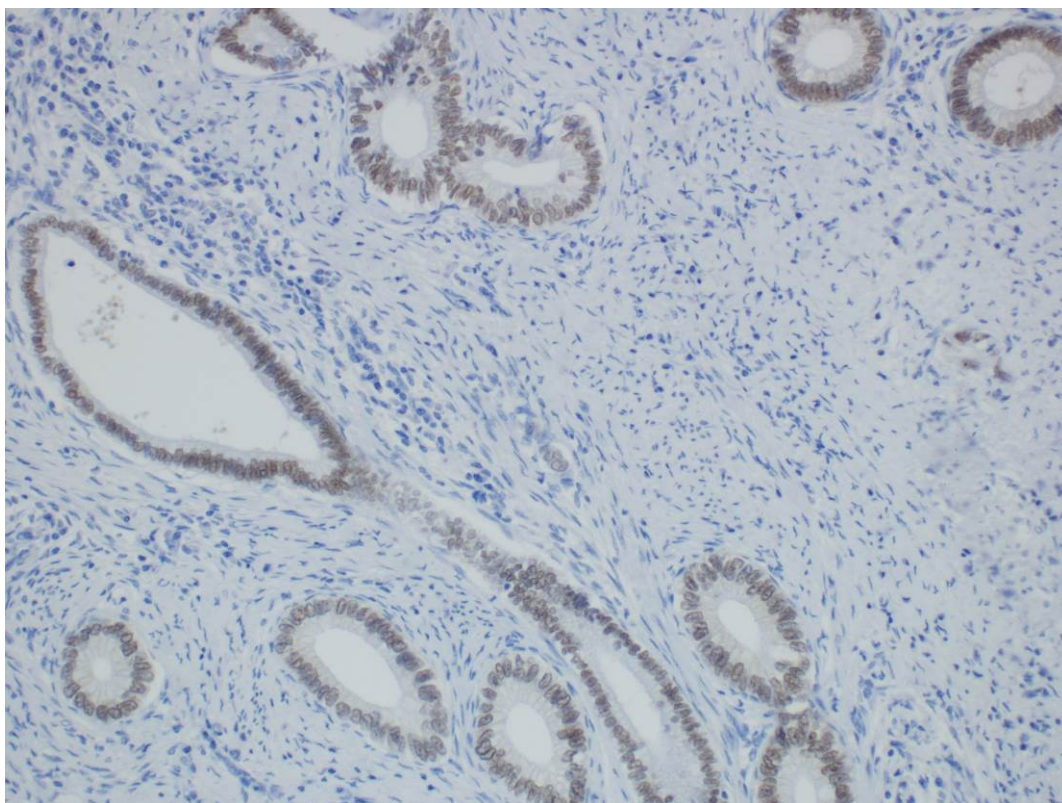
Patient No.	<i>TP53</i>	<i>PTEN</i>	<i>EGFR</i>	<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>
1	N	del	wt	wt	wt	wt
2	N	N	wt	wt	wt	wt
3	N	del	wt	wt	wt	N/A
4	N	N	wt	wt	wt	wt
	N	N	wt	wt	wt	N/A
5	N	N	wt	mut 12asp	wt	wt
	N	N	wt	mut 12asp	wt	wt
6	N	N	N/A	N/A	wt	wt
	N	N	wt	wt	wt	wt
7	N	N	N/A	wt	wt	wt
8	N	N	N/A	N/A	N/A	wt
9	N	del	wt	wt	wt	wt
	N	del	wt	wt	wt	N/A
10	N	N	wt	mut 12asp	wt	wt
11	N	N	wt	mut 12 cys	wt	wt
12	N	N	wt	wt	wt	wt
13	N	N	wt	wt	wt	wt
14	N	N	wt	wt	wt	wt
15	N	N	wt	mut 12ala	wt	wt
16	N	N	wt	wt	N/A	wt
17	N	N	wt	wt	wt	wt

N/A - nepoužitelné (málo materiálu pro analýzu nebo technické limity); N - normalní; wt - wild type = divoký typ; del - delece; mut - mutace



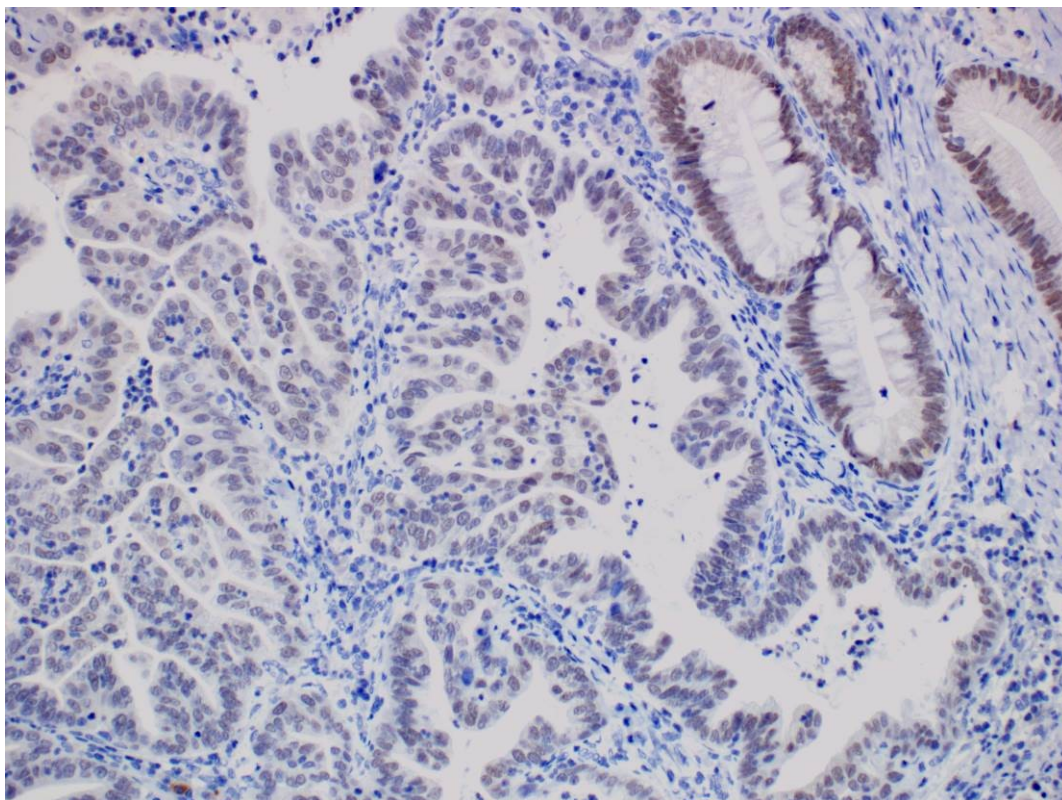
Obrázek 1. Silná jaderná exprese HNF-1 β v adenokarcinomu děložního čípku.

Silná jaderná exprese HNF-1 β v dobřed diferencovaném adenokarcinomu děložního čípku. Zvětšení 200 krát.



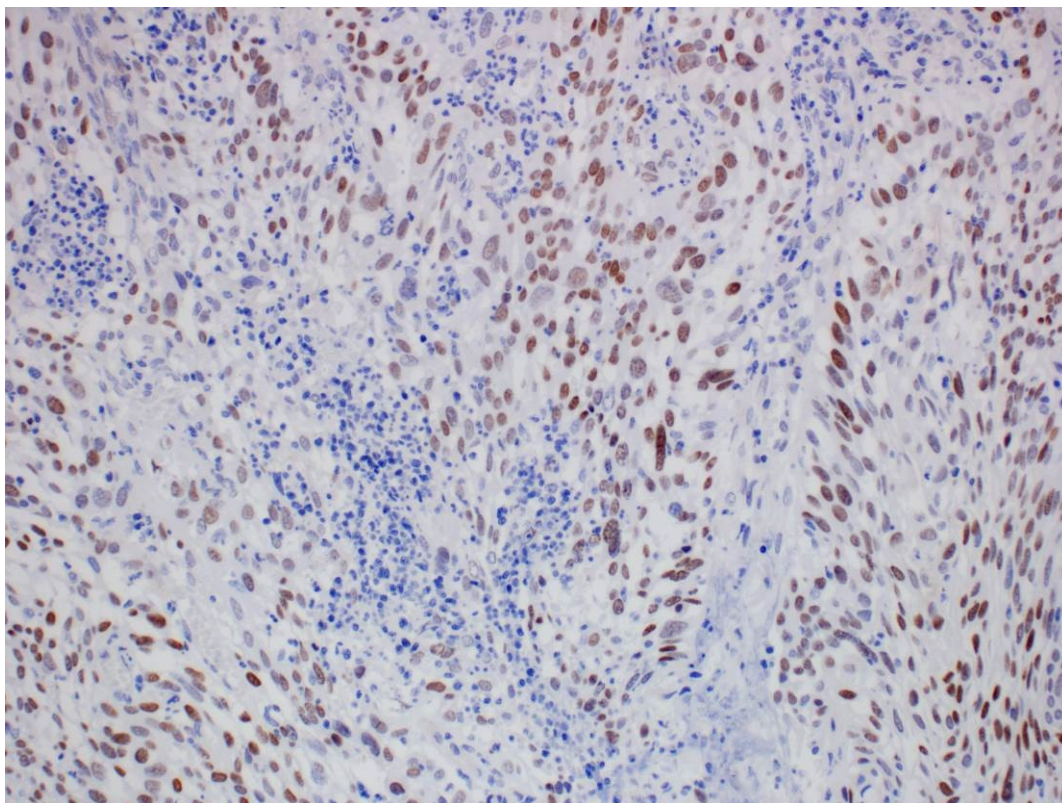
Obrázek 2. Středně silná exprese HNF-1 β v adenokarcinomu děložního čípku.

Zvětšení 200 krát.



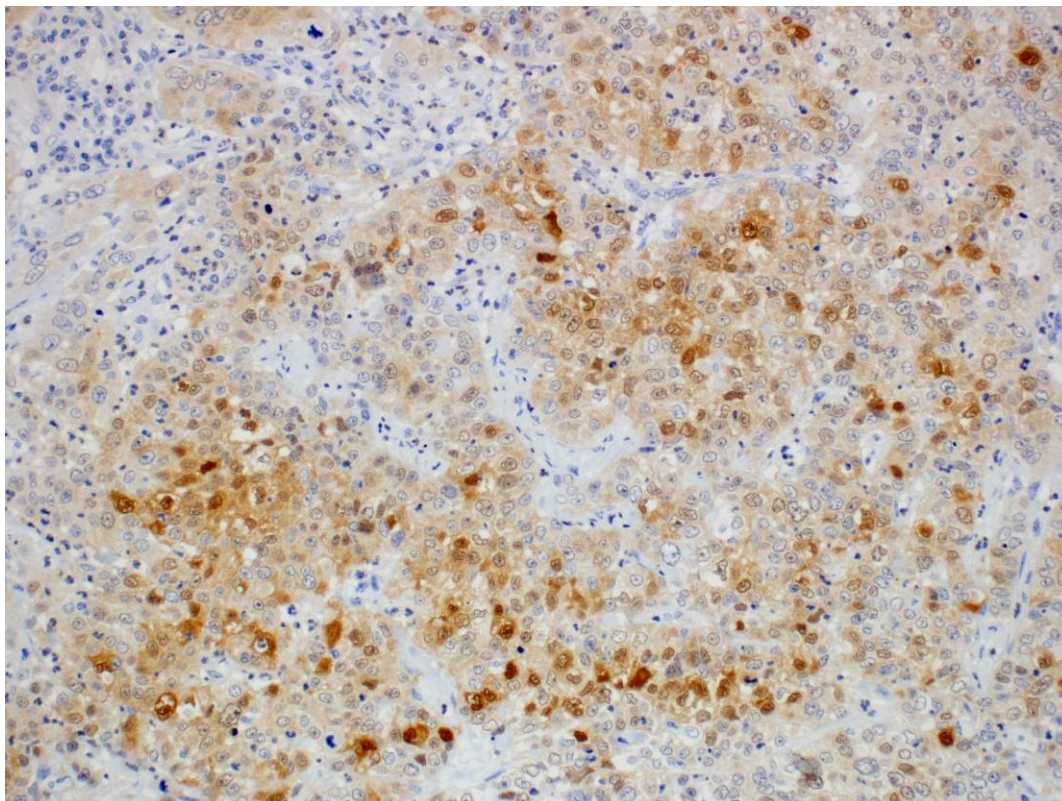
Obrázek 3. Slabá exprese HNF-1 β v adenokarcinomu děložního čípku.

Slabá jaderná exprese HNF-1 β v adenokarcinomu a středně silná exprese v normálních endocervikálních žlázkách (v pravém horním rohu). Zvětšení 200 krát.



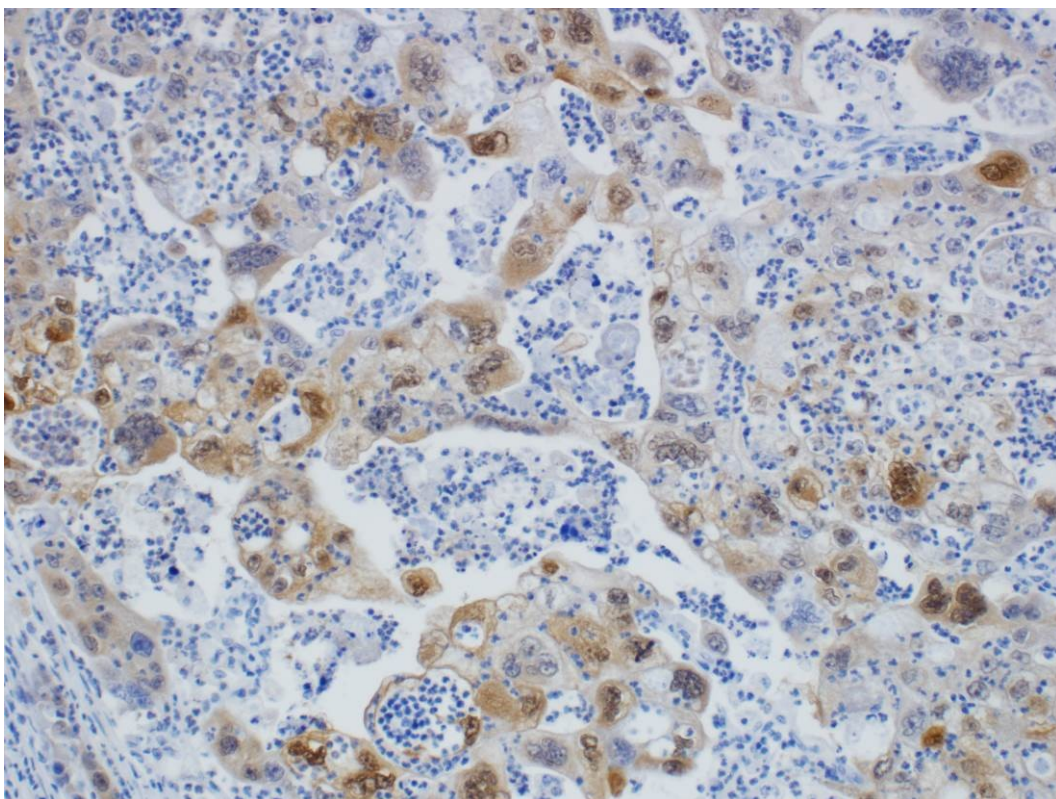
Obrázek 4. Silná exprese HNF-1 β v dlaždicobuněčném karcinomu děložního čípku.

Silná jaderná exprese HNF-1 β v dlaždicobuněčném karcinomu. Zvětšení 200 krát.



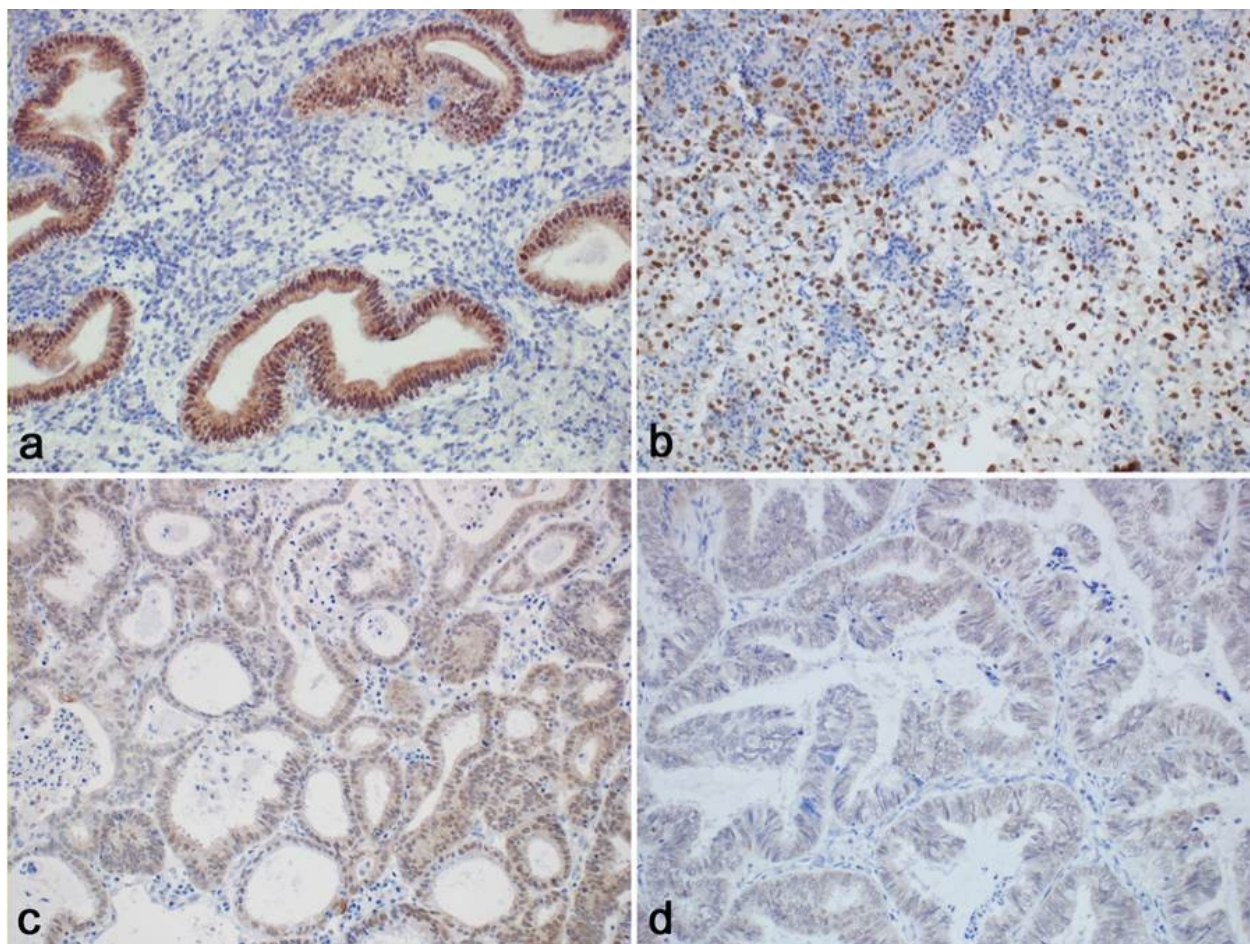
Obrázek 5. Fokální exprese HNF-1 β v dlaždicobuněčném karcinomu děložního čípku.

Fokální exprese HNF-1 β v dlaždicobuněčném karcinomu, s nespecifickou pozitivitou cytoplasmy v některých nádorových buňkách. Zvětšení 200x.



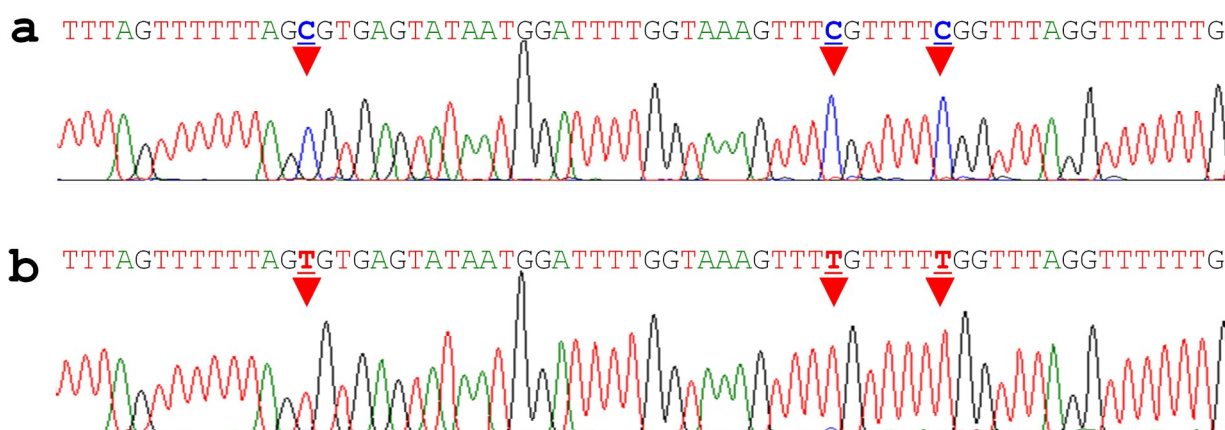
Obrázek 6. Expres HNF-1 β v nediferencovaném karcinomu děložního čípku.

Fokální exprese HNF-1 β v nediferencovaném karcinomu, s nespecifickou pozitivitou cytoplasmy v některých nádorových buňkách. Zvětšení 400 krát.

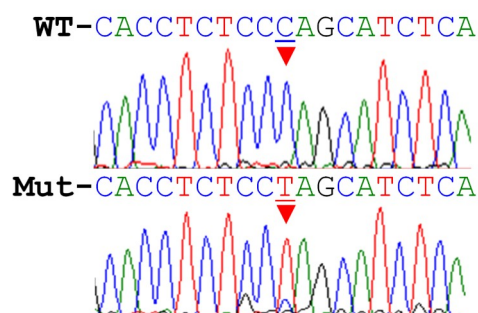


Obrázek 7. Expres HNF-1 β v lézích a nádorech endometria.

(a) Silná jaderná exprese HNF-1 β v sekrečním endometriu. Zvětšení 400 krát. (b) Ve světlobuněčném karcinomu. Zvětšení 200 krát. (c) Středně silná exprese HNF-1 β v dobře diferencovaném endometrioidním karcinomu. Zvětšení 400 krát. (d) Slabá exprese HNF-1 β v dobře diferencovaném endometrioidním karcinomu. Zvětšení 400 krát. V některých případech byla zastižena nespecifická pozitivita cytoplasmy.



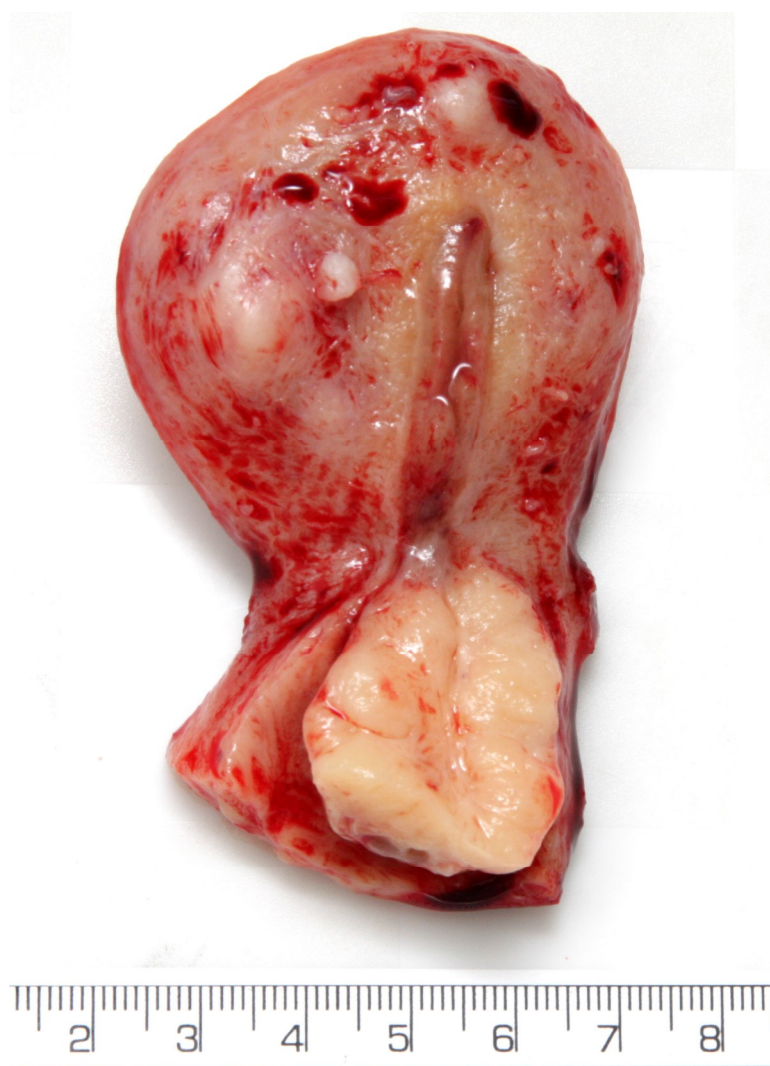
c.454C>T, p.Gln152X



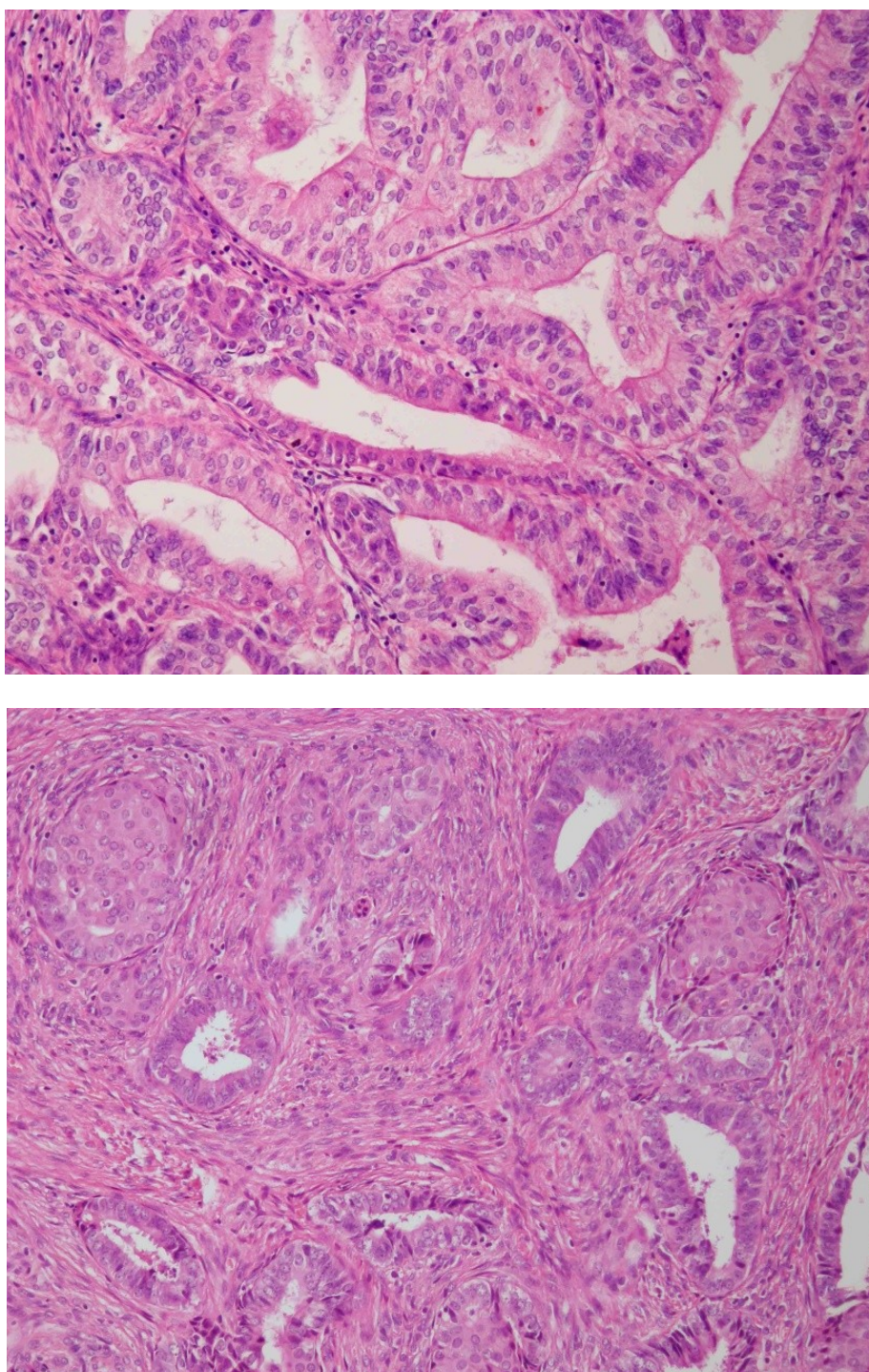
Obrázek 8. Bisulfitový sekvenační elektroforeogram a nově nalezená frame-shift mutace genu HNF1B.

Horní elektroforeogram ukazuje metylační stav ve třech CpG místech od promotoru genu HNF1B. Reprezentativní elektroforeogram (a) metylovaný a (b) nemetylovaný. Červené trojúhelníčky označují cytosiny v CpG ostrůvcích.

Dolní elektroforeogram ukazuje srovnání mezi „divokou“ (WT) a mutovanou (Mut) sekvencí. Změna nukleotidu je označena trojúhelníčkem.



Obrázek 9. Atypický polypózní adenomyom- makrofoto.



Obrázek 10. Atypický polypózní adenomyom – mikrofoto, histologické znaky.

Epitelová komponenta je tvořena žlázkami endometroidního typu, které vykazují mírný až střední stupeň jaderných atypií. Typickým znakem léze je tvorba skvamózních morul. Mezenchymální komponenta je leiomyomatózní či fibromyomatózní. Zvětšení 400 krát (nahore) a 200 krát (dole).



RESEARCH

Open Access

Expression of HNF-1 β in cervical carcinomas: an immunohistochemical study of 155 cases

Kristýna Němejcová^{1†}, David Cibula² and Pavel Dundr^{1*†}

Abstract

Background: HNF-1 β is a commonly used marker in the differential diagnosis of clear cell carcinoma of the ovary and endometrium. Recent studies have found HNF-1 β expression to a lesser extent in other ovarian and endometrial tumors including endometrioid, mucinous and, rarely, serous carcinoma. Regarding cervical carcinoma, HNF-1 β expression has been mentioned exceptionally in mesonephric and some other types of adenocarcinoma. However, a systematic analysis of HNF-1 β expression in cervical carcinomas has not been performed to date.

Methods: We analyzed HNF-1 β expression in 155 cervical carcinomas (including 56 adenocarcinomas, 85 squamous cell carcinomas and 14 undifferentiated carcinomas). Expression of HNF-1 β was correlated with the expression of other markers including estrogen receptors, progesterone receptors, CEA, p63, p40, p16, and D2-40.

Results: Adenocarcinomas showed expression of HNF-1 β in 42/56 cases (75%), CEA in 48/56 cases (85.7%), p63 in 4/56 cases (7.2%), p40 in 2/56 cases (3.6%), estrogen receptors in 9/56 cases (16.1%), progesterone receptors in 5/56 cases (8.9%), p16 in 56/56 (100%) cases, and D2-40 in 0/56 cases (0%). Squamous cell carcinomas showed expression of HNF-1 β in 2/85 cases (2.35%), CEA in 77/85 cases (90.6%), p63 and p40 in 85/85 cases (100%), estrogen receptors in 9/85 cases (10.6%), progesterone receptors in 1/85 cases (1.2%), p16 in 84/85 cases (98.8%), and D2-40 in 45/84 cases (53.6%). Undifferentiated carcinomas showed expression of HNF-1 β in 2/14 cases (14.3%), CEA in 8/14 cases (57.1%), p16 in 14/14 cases (100%), hormone receptors in 0/13 cases (0%), p63 in 7/14 cases (50%), p40 in 5/14 cases (35.7%), and D2-40 in 1/14 cases (7.1%).

Conclusions: In cervical carcinoma, expression of HNF-1 β is mostly restricted to adenocarcinomas and can be used as an auxiliary adenocarcinoma marker in the differential diagnosis of poorly differentiated cervical carcinomas. HNF-1 β as an adenocarcinoma marker and p63/p40 and D2-40 as a squamous cell carcinoma markers are highly specific with variable sensitivity. Optimal results can be achieved using these markers in a panel.

Virtual Slides: The virtual slide(s) for this article can be found here: <http://www.diagnosticpathology.diagnomx.eu/vs/1348836442160205>.

Keywords: HNF-1 β , Squamous cell carcinoma, Undifferentiated carcinoma, Immunohistochemistry

Background

Hepatocyte nuclear factor 1 beta (HNF-1 β) is a transcription factor that plays a crucial role in the differentiation of visceral endoderm from the primitive endoderm [1,2]. In normal tissues, HNF-1 β is expressed in epithelial cells of the urogenital tract, liver, pancreas, gut, and lung [3-5]. However, this marker can be expressed in several types of

tumors. In gynecopathology, expression of HNF-1 β is commonly used in the differential diagnosis of clear cell carcinomas of the ovary and endometrium. However, recent studies have found HNF-1 β expression to a lesser extent in other tumor types including endometrioid, mucinous and, rarely, serous carcinoma and even in some non-neoplastic tissues [6,7]. In cervical carcinoma, expression of HNF-1 β has been mentioned in mesonephric and other types of adenocarcinoma [8,9]. However, a systematic analysis of HNF-1 β expression in cervical carcinoma has not been performed to date. In our study, we examined HNF-1 β expression in invasive carcinomas of the

* Correspondence: pdundr@seznam.cz

†Equal contributors

¹Department of Pathology, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University in Prague, Studnickova 2, Prague 2 12800, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Němejcová et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

uterine cervix. Expression of this marker was correlated with expression of other markers including estrogen receptors, progesterone receptors, CEA, p63, p40, p16, and D2-40.

Methods

In total, 155 specimens were included in the study, including 56 adenocarcinomas (46 endocervical adenocarcinomas, usual type; 8 mucinous carcinomas, NOS; 2 mucinous carcinomas, intestinal type), 86 squamous cell carcinomas and 13 undifferentiated carcinomas. All cases were selected from files of our department (Department of Pathology, the First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University in Prague). In all cases, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks were available for subsequent immunohistochemical analysis. Tissue blocks containing only a small amount of tumor or otherwise inadequate samples were excluded. Selected cases represented routine diagnostic surgical specimens including 37 endocervical curettage, 8 punch biopsy, 19 cone biopsy, and 91 hysterectomy specimens. In compliance with the Helsinki Declaration, the project has been approved by Ethics Committee of General University Hospital in Prague.

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical analysis was performed using the avidin-biotin complex method with antibodies against the following antigens: HNF-1 β (polyclonal, dilution 1:500, Sigma-Aldrich, Prestige Antibodies, St. Louis, United States), estrogen receptor (clone GF11, dilution 1:50, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom), progesterone receptor (clone 16, dilution 1:200, Novocastra), CEA (clone II-7, dilution 1:100, Dako, Glostrup, Denmark), p63 (clone 4A4, dilution 1:50, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA), p40 (polyclonal, dilution 1:50, BioSystems), p16 (clone E6H4, CINtec[®] Histology Kit, Roche mtm Laboratories AG, Mannheim, Germany), and D2-40 (clone D2-40, dilution 1:100, Dako). Antigen retrieval was performed including pretreatment in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) for 40 min in a water bath at 98°C for progesterone receptors and CEA. Heat-induced epitope retrieval was done in 0.01 citrate buffer (pH 6.1) for HNF-1 β , and in 0.01 citrate buffer (pH 9.0) for estrogen receptors, p63 and p40. All antibodies were processed manually, except for p16, which was stained on a Ventana Benchmark immunostainer (CINtec[®] Histology Kit, Roche mtm laboratories AG, Mannheim, Germany).

Immunohistochemical results were semiquantitatively assessed and graded on a four-tier scale based on the percentage of positive cells: 0 = <5%; 1 = 5-29%; 2 = 30-59%; 3 = >60% positive cells. For HNF-1 β , estrogen receptors, progesterone receptors, p63, and p40 only nuclear staining

was regarded as positive. For p16, nuclear and cytoplasmic staining was considered as positive. Positivity of CEA and D2-40 was defined as distinct membrane staining. Moreover, the staining intensity of HNF-1 β was assessed as weak, moderate or strong.

Results

Patients' age ranged from 23 to 86 years (mean 53.7; median 55.0). The 56 ACAs included 46 endocervical adenocarcinomas, usual type, 8 mucinous carcinomas, NOS, and 2 mucinous carcinomas, intestinal type). Thirty-seven cases were moderately differentiated, 15 cases were poorly differentiated, and 4 cases were well differentiated. In the group of 86 SCC, 2 cases were well differentiated, 49 cases moderately differentiated and 34 cases poorly differentiated. We focused only on "usual" types of endocervical adenocarcinoma and other types of cervical adenocarcinoma (including serous, endometrioid, and clear cell) were excluded from the study. However, 4 cases of clear cell adenocarcinoma were used as a positive control for HNF-1 β staining (all 4 cases showed strong 3+ positivity).

Immunohistochemistry

All the results are summarized in Table 1. Table 2 summarizes antibodies which can be used in the differential diagnosis of ACA and SCC. Figure 1 shows HNF-1 β expression in cervical carcinomas.

Adenocarcinomas

Expression of HNF-1 β was found in 42/56 ACAs (75%). Twenty-seven cases were 3+ positive, eight cases showed 2+ positivity, and seven cases were positive only focally 1+. Intensity of staining was highest in the group of 3+ positive cases (2 lesions showed strong positivity, 17 lesions showed moderate positivity and 8 lesions weak positivity). In the group of 2+ and 1+ positive lesions, the intensity of staining varied between weak to moderate.

Simultaneous expression of p63 and p40 was found in 2/56 tumors (3.6%). Two other cases were p63 weakly positive (1+) without simultaneous expression of p40 (both of them with weak intensity of staining). Estrogen receptors were positive in 9/56 cases (16.1%), two cases strongly 3+, one 2+ and remaining 6 weakly 1+ positive. In 5 of these cases was also found simultaneous expression of progesterone receptors. CEA was positive in 48/56 cases (85.7%) of ACAs and p16 was positive in all 56 ACAs. None of the ACAs showed D2-40 positivity.

Squamous cell carcinomas

SCC showed expression of HNF-1 β in 2/85 cases (2.35%). These cases expressed HNF-1 β in approximately 70% and 30% of tumor cells, respectively. Both cases were simultaneously strongly p16, p63, and p40 positive, and showed

Table 1 Immunohistochemical findings in cervical carcinomas

	HNF-1 β		ER		PR		CEA		p16		p63		p40		D2-40	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg
ACA (56 cases)	42 (75%)	14 (25%)	9 (16.1%)	47 (83.9%)	5 (8.9%)	51 (91.1%)	48 (85.7%)	8 (14.3%)	56 (100%)	0 (0%)	4 (7.2%)	52 (92.8%)	2 (3.6%)	54 (96.4%)	0 (0%)	56 (100%)
3+	27 (48.2%)	2 (3.6%)	2 (3.6%)	3 (5.4%)	3 (5.4%)	1 (1.8%)	13 (23.2%)	2 (3.6%)	2 (3.6%)	1 (1.8%)	0	1 (1.8%)	1 (1.8%)	0	1 (1.8%)	0
2+	8 (14.3%)	1 (1.8%)	1 (1.8%)	1 (1.8%)	1 (1.8%)	4 (7.1%)	4 (7.1%)	2 (3.6%)	2 (3.6%)	3 (5.4%)	1 (1.8%)	1 (1.8%)	1 (1.8%)	0	1 (1.8%)	0
1+	7 (12.5%)	6 (10.7%)	6 (10.7%)	76 (89.4%)	1 (1.2%)	84 (98.8%)	77 (90.6%)	8 (9.4%)	84 (98.8%)	1 (1.2%)	85 (100%)	0 (0%)	85 (100%)	0 (0%)	45 (53.6%)	39 (46.4%)
SCC (85 cases)	2 (2.35%)	83 (97.65%)	9 (10.6%)	76 (89.4%)	1 (1.2%)	84 (98.8%)	77 (90.6%)	8 (9.4%)	84 (98.8%)	1 (1.2%)	85 (100%)	0 (0%)	85 (100%)	0 (0%)	45 (53.6%)	39 (46.4%)
3+	1 (1.2%)	3 (3.5%)	3 (3.5%)	0	0	0	13 (15.3%)	83 (97.6%)	83 (97.6%)	0	83 (97.6%)	2 (2.4%)	83 (97.6%)	2 (2.4%)	15 (17.9%)	15 (17.9%)
2+	1 (1.2%)	2 (2.4%)	2 (2.4%)	0	0	0	15 (17.6%)	0	0	2 (2.4%)	2 (2.4%)	0	2 (2.4%)	0	15 (17.9%)	15 (17.9%)
1+	0	4 (4.7%)	4 (4.7%)	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)	49 (57.6%)	1 (1.2%)	1 (1.2%)	0	0	0	0	0	15 (17.9%)	15 (17.9%)
UC (14 cases)	2 (14.3%)	12 (85.7%)	0 (0%)	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)	8 (57.1%)	6 (42.9%)	14 (100%)	0 (0%)	7 (50%)	7 (50%)	5 (35.7%)	9 (64.3%)	1 (7.1%)	13 (92.9%)
3+	1 (7.1%)	1 (7.1%)	1 (7.1%)	13 (92.9%)	0	13 (92.9%)	1 (7.1%)	13 (92.9%)	13 (92.9%)	0	4 (28.6%)	4 (28.6%)	4 (28.6%)	4 (28.6%)	0	0
2+	0	0	0	2 (14.3%)	0	2 (14.3%)	2 (14.3%)	0	0	1 (7.1%)	1 (7.1%)	0	0	0	1 (7.1%)	1 (7.1%)
1+	1 (7.1%)	0	0	5 (35.7%)	1 (7.1%)	5 (35.7%)	5 (35.7%)	0	1 (7.1%)	2 (14.3%)	2 (14.3%)	0	1 (7.1%)	1 (7.1%)	0	0

ACA = adenocarcinomas, SCC = squamous cell carcinomas, UC = undifferentiated carcinomas. Pos = positive, Neg = negative. Immunohistochemical results of HNF-1 β , estrogen receptors, progesterone receptors, CEA, p63, p40, p16, and D2-40 were semiquantitatively assessed and graded on a four-tier scale based on the percentage of positive cells: 0 = <5%, 1 = 5-29%, 2 = 30-59%, 3 = >60% positive cells.

Table 2 Summary of antibodies which can be used in differential diagnosis of ACA and SCC

	ACA	SCC
HNF-1 β	++ (75%)	- (2%)
p63/p40	—+ (7% / 4%)	+++ (100%)
CEA	+++ (86%)	+++ (91%)
ER	+— (16%)	+— (11%)
PR	+— (9%)	- (1%)
D2-40	- (0%)	++ (54%)

ACA - adenocarcinoma; SCC - squamous cell carcinoma.
In brackets is a percentage of positive cases in our study.

1+ and 2+ expression of CEA. All SCCs were p63 and p40 positive. 9/85 (10.6%) SCCs were estrogen receptors positive and one of them was progesterone receptors positive 1/85 (1.2%). CEA was positive in 77/85 cases (90.6%). P16 showed positivity in all but one SCC. The negative case was HNF-1 β , estrogen receptors, progesterone receptors and CEA negative, and strongly 3+ p63 and p40 positive. D2-40 was positive in 45/84 cases (53.6%). In one case there was not enough material for analysis.

Undifferentiated carcinomas

Undifferentiated carcinomas showed expression of HNF-1 β in 2/14 cases (14.3%). In one case (3+) the positivity was strong in approximately 70% of tumor cells. In second case (1+) the positivity was strong in approximately 10% of tumor cells. Both cases were estrogen receptor and progesterone receptor negative. The former was simultaneously CEA, p63, and p40 negative and showed p16 1+ positivity, and the latter was CEA 2+ positive, p16 3+ positive, p63 1+ positive and p40 negative. Alcian blue staining at pH 2.5 was negative in both cases. Expression of CEA was positive in 8/14 cases (57.14%). All tumors were p16 positive and hormone receptor negative. P63 was positive in 7/14 cases (50%) and p40 was positive in 5/14 (35.7%) cases. P63 and p40 were simultaneously positive in 5 cases (4 were 3+ and 1 was 1+). Two other p63 positive cases (1+ and 2+) were p40 negative. Only one of p63/p40 3+ positive cases was simultaneously D2-40 positive. Other 12/13 cases were D2-40 negative.

Non-neoplastic tissue

Non-neoplastic squamous epithelium was found in immunohistochemically examined slides in 59 cases. In

all these cases, HNF-1 β was negative in this epithelium. Non-neoplastic glands or superficial columnar epithelium was found in 33 cases. 21/33 cases (63.6%) were HNF-1 β positive, 19 cases with weak and 2 cases with moderate intensity of staining.

Discussion

The hepatocyte nuclear factor 1 (HNF-1) transcription factor family includes HNF-1 (also known as HNF-1 α , Tcf-1), and variant isoforms of the HNF-1 (vHNF-1) (also known as HNF-1 β , Tcf-2, LFB3). These transcription factors are expressed in a different spatio-temporal manner in the yolk sac endoderm, and in the developing kidney, liver, and pancreas [10]. HNF-1 β is also expressed in the developing neural tube, lungs, and entire urogenital system [3-5]. Functions of HNF-1 family proteins are essential for different stages of ontogenesis. HNF-1 β is crucial in the differentiation of visceral endoderm from the primitive endoderm and is essential for formation of kidney tubules, intrahepatic bile ducts and gallbladder, and specification of pancreatic primordium [1,2]. In humans, mutations in the HNF-1 β gene are associated with a number of diseases associated with defects in kidney development and a complex syndrome known as renal cysts and diabetes (RCAD), characterized by multiple abnormalities of the kidney, male and female genital tract, and by early-onset diabetes, pancreatic hypoplasia, and liver dysfunction [11,12].

In normal tissues, HNF-1 β is expressed in epithelial cells of the urogenital tract, liver, pancreas, gut, and lung [3-5]. In tumors, mutations and epigenetic inactivation of the HNF-1 β gene has been shown to be involved in the development of several cancer [13-15]. Methylation of the HNF-1 β gene promoter was found in some cancer cell lines derived from pancreatic, colorectal, gastric, and ovarian tumors [16]. Tumor cell lines with a mutation in HNF-1 β usually show a loss of protein expression as detected by immunohistochemistry [17]. On the contrary, some tumors show up-regulation of HNF-1 β and expression of this protein is found in most clear cell carcinomas of pancreas, endometrium, ovary and kidney [6,13,14,18,19]. It has been shown that down-regulation of HNF-1 β in clear-cell renal cell carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis [15]. However, the precise role of HNF-1 β in carcinogenesis as well as the importance of molecular targeting of this protein for therapeutic purposes remains unknown.

Regarding to the expression of HNF-1 β in non-neoplastic tissue and neoplasms of the female genital tract, only a few studies have analyzed HNF-1 β expression in endometriosis, normal endometrium, and tumors of cervix, endometrium and ovary. Most of these studies found that expression of HNF-1 β is mostly restricted to clear cell

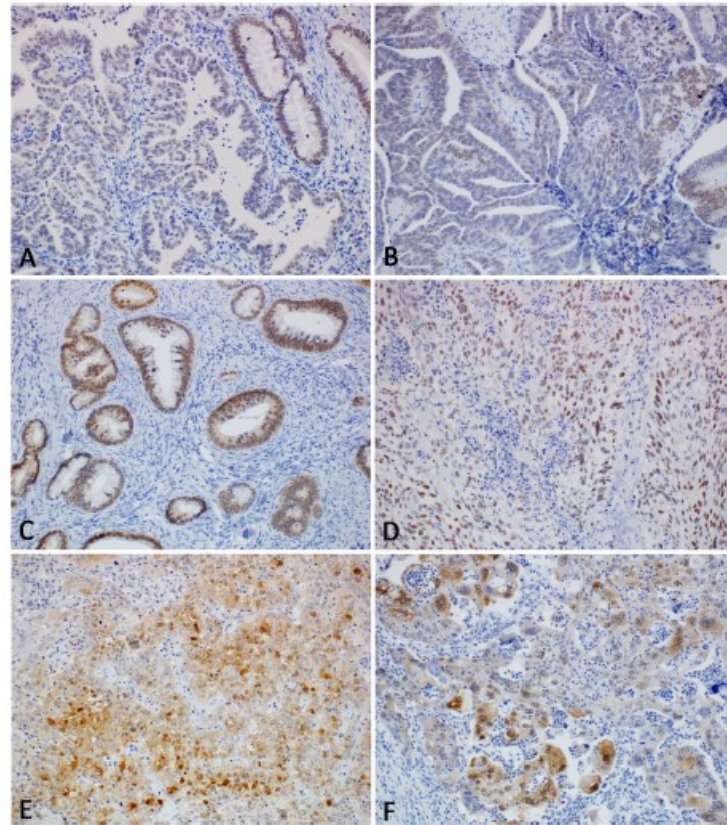


Figure 1 HNF-1 β expression in cervical carcinomas. (A) Weak nuclear expression of HNF-1 β in adenocarcinoma. Note moderate HNF-1 β expression in normal endocervical glands (upper right corner) (200x). (B) Moderate expression of HNF-1 β in adenocarcinoma (200x). (C) Well differentiated adenocarcinoma showing strong expression of HNF-1 β (200x). (D) Strong expression of HNF-1 β in squamous cell carcinoma (200x). (E) Focal nuclear expression of HNF-1 β in squamous cell carcinoma. Note non-specific cytoplasmic staining in some tumor cells (200x). (F) Focal nuclear expression of HNF-1 β in undifferentiated carcinoma. Note non-specific cytoplasmic staining in some tumor cells (200x).

adenocarcinoma and concluded that this marker is specific for clear cell adenocarcinoma [6,13,17,18]. However, in other studies, the authors described HNF-1 β expression not only in clear cell adenocarcinoma, but also in other tumor types including serous, endometrioid and mucinous carcinoma, and most types of borderline tumors [8,20-22]. Some recent studies have found expression of HNF-1 β in some cases of endometriosis (particularly atypical or with inflammatory changes) and in normal endometrium, especially in the secretory phase or gestational state [22,23]. Expression of HNF-1 β was not found in the ovarian surface epithelium. However, one study described its expression in some ovarian inclusion cysts [22].

Expression of HNF-1 β in carcinoma of the uterine cervix has been mentioned only in two studies. One of them

focused on the HPV status and immunohistochemical profiles of unusual histologic subtypes of endocervical adenocarcinoma [8]. This study examined 26 cases of various subtypes of cervical adenocarcinomas. HNF-1 β was positive in 7/9 (78%) clear cell carcinoma, in 2/5 (40%) of usual type of endocervical adenocarcinoma, in 3/11 (27%) of gastric-type of endocervical adenocarcinoma, in 3/3 (100%) minimal deviation adenocarcinoma, in 1/1 (100%) mesonephric adenocarcinoma, in 1/1 (100%) serous adenocarcinoma, and in 1/1 (100%) malignant mixed Müllerian tumor. In a second study, focused on the immunohistochemical analysis of seven mesonephric adenocarcinomas, expression of HNF-1 β was found in 3/7 cases (42.8%) [9].

Distinguishing between poorly differentiated adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix

can be difficult and in some cases is almost impossible based only on histological features. Clinically, however, this distinction is important and can modify therapeutic decisions, in particular because of squamous cell carcinoma radiosensitivity. Immunohistochemistry can be of help in poorly differentiated tumors, particularly with antibodies against p63 or p40 as markers of stratified epithelium. Moreover, some papers also describe the expression of D2-40 in a subset of squamous cell carcinomas [24–26]. Other markers such as CEA, cytokeratin 7, as well as the estrogen and progesterone receptors are not helpful in distinguishing these tumors [27,28].

In our study, we found expression of HNF-1 β in 42/56 cases of adenocarcinoma (75%) and in 2 only /85 cases of SCC (2.35%). Expression D2-40 was positive in 45/84 SCC (53.6%) and 0/56 of ACAs. Expression of p63 and p40 was found in a coordinate staining pattern in 2/56 adenocarcinoma (3.6%) and 85/85 SCC (100%). Moreover, weak expression of p63 without expression of p40 was found in other two adenocarcinoma cases. Regarding undifferentiated carcinomas, we propose that these tumors can be subclassified based on the immunohistochemical profile into three groups: possible adenocarcinoma (2/14 cases; 14.3%) characterized by positivity for HNF-1 β and negativity of p40 and D2-40; possible SCC (5/14 cases; 35.7%) characterized by positivity for p40/p63, variable expression of D2-40 and negativity for HNF-1 β ; undifferentiated carcinoma, NOS (7/14 cases; 50%) characterized by HNF-1 β , p63/p40, and D2-40 negativity.

Conclusions

Based on our results, expression of HNF-1 β is mostly restricted to adenocarcinomas and can be used as an auxiliary adenocarcinoma marker in the differential diagnosis of poorly differentiated cervical carcinomas. According to our results, HNF-1 β can be considered an adenocarcinoma marker while p63/p40 and D2-40 are highly specific markers of SCC with variable sensitivity. Optimal results can be achieved by using these markers in a panel. Limitation of the utility of HNF-1 β includes expression in benign glands, which preclude use of this marker in the differential diagnosis of benign lesions and well differentiated p16 negative types of cervical adenocarcinoma. Also, the positivity of HNF-1 β in a subset of endometrioid adenocarcinoma prevents the use of this marker in the differential diagnosis between endometrioid and endocervical type of adenocarcinoma.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

KN carried out the immunohistochemical analysis, collected and interpreted data, prepared the design of the study, and drafted the manuscript. DC collected and interpreted data, participated in the conception and design of

the study, and helped to draft the manuscript. PD conceived of the study, helped with immunohistochemical analysis and participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by IGA MZ CR project NT14001-3/2013, by Charles University in Prague (Project PRVOUK-P27/LF-1/1, UNCE 204024, and SVV 260022), and by the project BBM LM2010004.

Author details

¹Department of Pathology, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University in Prague, Studnickova 2, Prague 2 12800, Czech Republic. ²Oncogynecological Centre, Department of Obstetrics and Gynecology, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University in Prague, Studnickova 2, Prague 2 12800, Czech Republic.

Received: 11 February 2015 Accepted: 9 March 2015

Published online: 25 March 2015

References

- Barbacci E, Chalkiadaki A, Masdeu C, Haumaitre C, Lokmane I, Loiet C, et al. HNF1 β /TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum Mol Genet.* 2004;13:3139–49.
- Cereghini S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 1996;10:267–82.
- De Simone V, De Magistris L, Lazzaro D, Gerstner J, Monadi P, Nicosia A, et al. LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J.* 1991;10:1435–43.
- Haumaitre C, Reber M, Cereghini S. Functions of HNF1 family members in differentiation of the visceral endoderm cell lineage. *J Biol Chem.* 2003;278:40933–42.
- Lazzaro D, De Simone V, De Magistris L, Lehtonen E, Cortese R. LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. *Development.* 1992;114:469–79.
- Yamamoto S, Tsuda H, Aida S, Shimazaki H, Tamai S, Matsubara O. Immunohistochemical detection of hepatocyte nuclear factor 1 β in ovarian and endometrial clear-cell adenocarcinomas and nonneoplastic endometrium. *Hum Pathol.* 2007;38:1074–80.
- Kajihara H, Yamada Y, Shigetomi H, Higashiyama Y, Kobayashi H. The dichotomy in the histogenesis of endometriosis-associated ovarian cancer: clear cell-type versus endometrioid-type adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2012;31:304–12. doi:10.1097/PGP.0b013e318243a97b.
- Park KI, Kiyokawa T, Soslow RA, Lamb CA, Oliva E, Zivanovic O, et al. Unusual endocervical adenocarcinomas: an immunohistochemical analysis with molecular detection of human papillomavirus. *Am J Surg Pathol.* 2011;35:633–46. doi:10.1097/PAS.0b013e31821534b9.
- Kenny SL, McBride HA, Jamison J, McCluggage WG. Mesonephric adenocarcinomas of the uterine cervix and corpus: HPV-negative neoplasms that are commonly PAX8, CA125, and HMG2 positive and that may be immunoreactive with TTF1 and hepatocyte nuclear factor 1- β . *Am J Surg Pathol.* 2012;36:799–807. doi:10.1097/PAS.0b013e31824a72c6.
- Cereghini S, Ott MO, Power S, Maury M. Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Development.* 1992;116:783–97.
- Bellanné-Chantelot C, Chauveau D, Gautier JF, Dubois-Laforgue D, Clauin S, Beaufils S, et al. Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1 β mutations. *Ann Intern Med.* 2004;140:510–7.
- Lokmane I, Haumaitre C, Garcia-Villalba P, Anselme I, Schneider-Maunoury S, Cereghini S. Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development.* 2008;135:2777–86. doi: 10.1242/dev.023010.
- Kato N, Tamura G, Motoyama T. Hypomethylation of hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) CpG island in clear cell carcinoma of the ovary. *Vichows Arch.* 2008;452:175–80.
- Kim L, Liao J, Zhang M, Talamonti M, Bentrem D, Rao S, et al. Clear cell carcinoma of the pancreas: histopathologic features and a unique biomarker: hepatocyte nuclear factor-1 beta. *Mod Pathol.* 2008;21:1075–83. doi:10.1038/modpathol.2008.95.
- Buchner A, Castro M, Hennig A, Popp T, Assmann G, Stief CG, et al. Downregulation of HNF-1 β in renal cell carcinoma is associated with tumor

- progression and poor prognosis. *Urology*. 2010;76:507. doi:10.1016/j.jurology.2010.03.042.
16. Terasawa K, Toyota M, Sagae S, Ogi K, Suzuki H, Sonoda T, et al. Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2006;94:914–21.
 17. Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, Ohki M, et al. Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 β as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2003;163:2503–12.
 18. Kato N, Sasou S, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol*. 2006;19:83–9.
 19. Kato N, Motoyama T. Hepatocyte nuclear factor-1beta(HNF-1beta) in human urogenital organs: its expression and role in embryogenesis and tumorigenesis. *Histol Histopathol*. 2009;24:1479–86.
 20. Fadare O, Liang SX. Diagnostic utility of hepatocyte nuclear factor 1-beta immunoreactivity in endometrial carcinomas: lack of specificity for endometrial clear cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20:580–7. doi:10.1097/PAI0b013e31824973days.
 21. Kalliger SE, Köbel M, Leung S, Mehl E, Gao D, Marcon KM, et al. Calculator for ovarian carcinoma subtype prediction. *Mod Pathol*. 2011;24:512–21. doi:10.1038/modpathol.2010.215.
 22. Tomassetti A, De Santis G, Castellano G, Miotti S, Mazzi M, Tomasoni D, et al. Variant HNF1 modulates epithelial plasticity of normal and transformed ovary cells. *Neoplasia*. 2008;10:1481–92.
 23. Worley MJ, Welch WR, Berkowitz RS, Ng SW. Endometriosis-associated ovarian cancer: a review of pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2013;14:5367–79. doi:10.3390/ijms14085367.
 24. Dumoff KL, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang PJ, Acs G. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol*. 2005;18:97–104.
 25. Chuang WY, Yeh CJ, Wu YC, Chao YK, Liu YH, Tseng CK, et al. Tumor cell expression of podoplanin correlates with nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*. 2009;24:1021–7.
 26. Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, et al. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer*. 2006;107:563–9.
 27. Toki T, Yajima A. Immunohistochemical localization of carcinoembryonic antigen (CEA) in squamous cell carcinoma of the uterine cervix: prognostic significance of localization pattern of CEA. *Tohoku J Exp Med*. 1991;165:25–32.
 28. Shen K, Yueng W, Ngan H. Estrogen and progesterone receptors in normal cervix and primary cervical carcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 1994;107:648–52.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Atypical Polypoid Adenomyoma of the Uterus

An Immunohistochemical and Molecular Study of 21 Cases

Kristýna Němejcová, MD,* Sarah L. Kenny, MB,† Jan Laco, PhD,‡ Petr Škapa, MD,§
Libor Staněk, MBiolSci,* Michal Zikán, PhD,|| Petra Kleiblová, PhD,¶##
W. Glenn McCluggage, FRCPath,† and Pavel Dundr, MD, PhD*

Abstract: Atypical polypoid adenomyoma (APA) is an uncommon uterine lesion that commonly recurs after local excision and is occasionally associated with or precedes the development of atypical hyperplasia or endometrioid adenocarcinoma. Despite the fact that about 230 cases have been reported in the literature, only 2 studies of 6 and of 7 cases have investigated the molecular aspects; as such, molecular alterations that occur in APA remain largely unknown. We undertook a comprehensive immunohistochemical and molecular analysis of 21 cases of APA in 17 patients (including 4 recurrent/persistent lesions). The analyzed genes were *PTEN* and *TP53* (by fluorescence in situ hybridization) and *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*, and *NRAS* (all by polymerase chain reaction). Immunohistochemical staining was performed for PTEN, p53, mTOR, β -catenin, HNF-1 β , and GLUT1 and for the mismatch-repair proteins MLH-1, MSH-2, MSH-6, and PMS-2. In most cases, there was nuclear expression of β -catenin in squamous morules and expression of HNF-1 β , mTOR, and GLUT1 in the glandular component. All cases exhibited “wild-type” expression of p53. A common finding was loss of PTEN expression (6/19 cases). In 1 of these cases, loss of PTEN expression was accompanied by *PTEN* deletion. Mutation of the *KRAS* gene was found in 5/19 cases. Intact mis-

match-repair protein expression was present in all cases, and *TP53* abnormalities or mutations of *EGFR*, *NRAS*, or *BRAF* genes were not found. Given the association with atypical hyperplasia and endometrioid adenocarcinoma and the shared immunohistochemical and molecular features, we feel that, conceptually, APA is best regarded as analogous to a localized form of atypical hyperplasia.

Key Words: uterus, atypical polypoid adenomyoma, atypical hyperplasia, molecular pathology, immunohistochemistry

(*Am J Surg Pathol* 2015;00:000–000)

Atypical polypoid adenomyoma (APA) is an uncommon uterine lesion first described in 1981.¹ It usually occurs in premenopausal women and most commonly involves the endometrium of the lower uterine segment or the upper endocervix as a polypoid mass, although all parts of the uterine corpus can be involved. As many patients with APA are in the reproductive age group, fertility preservation is a common issue. APA is regarded as a benign lesion, but in conservatively treated patients it is managed by curettage or polypectomy, recurrence/persistence is common, and there have been reports of the associated synchronous or metachronous occurrence of atypical hyperplasia (AH) or endometrioid adenocarcinoma (EC) either within the APA or the nonpolypoid endometrium; as such, management may be problematic.^{2–4} In this context, it is very important to determine the molecular events associated with the pathogenesis of APA and related to its biological potential. However, despite the fact that approximately 230 cases have been reported in the literature, only 2 studies comprising 6 and 7 cases have investigated the molecular aspects of APA.^{5,6}

In this study, we undertook a comprehensive immunohistochemical and molecular analysis of 21 cases of APA in 17 patients. We specifically concentrated on those molecular events and proteins involved in the pathogenesis of AH and EC given the association with APA.

MATERIALS AND METHODS

Cases

The cases were derived from the pathology archives of the institutions to which the authors are affiliated.

From the *Department of Pathology, First Faculty of Medicine and General University Hospital; †The Fingerland Department of Pathology, Faculty of Medicine and University Hospital Hradec Kralov; §Department of Pathology and Molecular Medicine, Second Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Motol; ||Department of Obstetrics and Gynecology, Oncogynecological Centre, First Faculty of Medicine and General University Hospital; ¶Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine; ##Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, General University Hospital in Prague, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; and †Department of Pathology, Royal Group of Hospitals Trust, Belfast, Northern Ireland, United Kingdom.

Conflicts of Interest and Source of Funding: Supported by Ministry of Health, Czech Republic (IGA MZ CR project NT14001-3/2013), by Charles University in Prague (Project PRVOUK-P27/LF1/1, PRVOUK P37/11, UNCE 204024, and SVV 260022), and by Bank of Biological Material project BBM LM2010004. The authors have disclosed that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this article.

Correspondence: Pavel Dundr, MD, PhD, Department of Pathology, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University in Prague, Studnickova 2, Prague 2, 12800, Czech Republic (e-mail: pdundr@seznam.cz).

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Twenty-one cases from 17 patients were included. Histologic review of the hematoxylin and eosin-stained slides was performed. In all cases, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks were available for immunohistochemical and molecular analysis. Six of the patients had recurrent/persistent lesions after curettage or polypectomy. However, in 1 of these, only material from the recurrent/persistent lesion was available (patient 7). In 4 other patients, there was enough material from the primary and recurrent/persistent lesions for the analysis (patients 4, 5, 6, and 9). One patient also developed a second recurrence (in this patient, material from the first recurrence was not available) (patient 11).

Immunohistochemical Analysis

Immunohistochemical staining was performed using the avidin-biotin complex method with antibodies against the following antigens: β -catenin (clone β -catenin-1, 1:400; Dako, Glostrup, Denmark), mTOR (phosphorylated, clone 7C10, 1:50; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA), GLUT1 (polyclonal, 1:100; Cell Marque, Rocklin, CA), HNF-1 β (polyclonal, 1:500; Sigma-Aldrich, Prestige antibodies, St Louis), p53 (clone DO7, 1:50; Immunotech, QC, Canada), PTEN (clone SP218, 1:200; Spring Bioscience, Pleasanton, CA), MLH-1 (clone G168-15, 1:50; Zytomed Systems, Berlin, Germany), MSH-2 (clone FE 11, 1:50; Zytomed Systems), MSH-6 (clone FE 11, 1:50; Zytomed Systems), and PMS-2 (clone EPR3947, ready-to-use; Zytomed Systems). Antigen retrieval was performed. This comprised pretreatment in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) for 40 minutes in a water bath at 98°C for β -catenin, mTOR, p53, PTEN, MSH-1, and MSH-6. Heat-induced epitope retrieval was performed in 0.01 M citrate buffer (pH 6.1) for HNF-1 β and in 0.01 M citrate buffer (pH 9.0) for GLUT1, PMS-2, and MLH-1.

β -catenin, HNF-1 β , PTEN, mTOR, and GLUT1 immunohistochemistry was semiquantitatively assessed and graded on a 5-tier scale on the basis of the percentage of positive cells: 0 = < 5%; 1+ = 5% to 10%; 2+ = 11% to 50%; 3+ = 51% to 75%; and 4+ = > 75% positive cells. For β -catenin, HNF-1 β , and GLUT1, the assessment was performed separately for glandular and squamous mucosal components. Expression of the mismatch-repair (MMR) proteins MLH-1, MSH-2, MSH-6, and PMS-2 was classified as negative (no nuclear staining of epithelial cells) or positive (convincing nuclear staining of any proportion of epithelial cells—in practice, many nuclei were positive in all cases). p53 protein expression was assessed as “wild-type” or “mutation-type.” “Mutation-type” staining was regarded as diffuse intense nuclear positivity of > 75% of epithelial cells or totally negative staining with a positive internal control in the form of weak nuclear staining of a proportion of stromal cells, whereas “wild-type” staining comprised focal, weak staining of a proportion of the epithelial nuclei.^{7,8} Only nuclear staining was regarded as positive for HNF-1 β , p53, MLH-1, MSH-2, MSH-6, PMS-2, PTEN, and β -catenin (cytoplasmic/membranous staining occurs normally and was disregarded). Cytoplasmic staining for mTOR and membranous staining for GLUT1 were interpreted as positive.

Fluorescence In Situ Hybridization

Numerical aberrations of *TP53* and *PTEN* genes were analyzed using the fluorescence in situ hybridization (FISH) method with probes ZytoLight SPEC TP53 Dual Color Probe (ZytoVision, Germany) and PTEN Dual Color Probe (ZytoVision). The assay procedure was conducted according to the manufacturer's instructions. Briefly, the slides with 2 to 3- μ m-thick sections of paraffin-embedded tissue were deparaffinized in xylene, then pretreated in 0.2 M HCl and subsequently in an NaSCN solution at 80°C. The next step was the proteolytic treatment. Protease II (25 mg) in a 50 mL saline solution at pH 2.0 was used with a digestion time of 60 minutes. Then, the sections were fixed in buffered formalin. In the next step, we applied the FISH probe, sealed it with a liquid rubber cement, codenatured the specimen and the DNA probe for 1 minute at 75°C, and then hybridized it overnight in a ThermoBrite system (Dako) at 37°C.

In each sample, a minimum of 100 nuclei (cutoff for numerical aberrations was 10% of positive nuclei) were evaluated using the Olympus Provis AX70 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Isolation of Nucleic Acid

Sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue were used for DNA isolation using standard procedures. Approximately seven 10- μ m-thick sections from each sample were deparaffinized in xylene. The DNA was then extracted using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hamburg, Germany).

Analysis of the *KRAS* and *EGFR* Genes

KRAS and *EGFR* StripAssay Kit (VenaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria) was used according to the manufacturer's instructions, with robotic hybridization system Bee20 (Bee Robotics Ltd, North Wales, UK). The *EGFR* gene was tested for mutations in exons 18, 19, 20, and 21, and the *KRAS* gene was tested for mutations in exons 2 and 3 (codon 12, 13, 61).

Analysis of the *NRAS* Gene

NRAS Mutation Analysis Kit (EntroGen, Los Angeles) was used for *NRAS* gene mutations in exon 2 (codon 12/13) and exon 3 (codon 61) according to the manufacturer's instructions using Light Cycler LC480 (Roche, Basel, Switzerland).

Analysis of the *BRAF* Gene

The Cobas 4800 *BRAF* V600 Mutation Test (Roche) was used for the analysis of V600 mutations in exon 15 of the *BRAF* gene according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

The age of the patients ranged from 29 to 53 years (mean 41 y; median 44 y). Clinical data, including follow-up, were available in 13/17 patients. In 6/13 patients with an available clinical history, the patients presented with abnormal uterine bleeding. Five lesions were asymptomatic and detected incidentally during radiologic inves-

tigations. In 2/13 patients, the lesion was discovered during investigations for infertility.

Seven patients underwent a hysterectomy (3 after preceding curettage or polypectomy; however, material from the pre-hysterectomy biopsy was available in only 2 patients). Four patients underwent a hysteroscopy with resection of the lesion by electrosurgical loop, and 2 underwent curettage (2 of these 6 patients subsequently had a hysterectomy).

Subsequently, 6/13 patients with available clinical history were diagnosed with a recurrent/persistent lesion from 1 to 8 months after first diagnosis. One patient exhibited 2 recurrences (3 and 8 mo after the first diagnosis).

Histologically, all lesions showed the typical morphologic features of APA and consisted of irregular endometrioid-type glands, often with a complex architectural pattern, arranged haphazardly within a fibromyomatous stroma. The degree of architectural complexity varied among the lesions. Squamous morules, in 1 case with central necrosis, were present in all but 2 cases. The glandular epithelium exhibited mild to moderate nuclear atypia. Neither AH nor EC were present in any case. Figure 1 shows representative images of APAs included in the study.

Immunohistochemical Findings

The results of the immunohistochemical analysis in the epithelial component are summarized in Table 1. The staining pattern of the stromal cells was as expected without any unusual patterns. Representative images of immunohistochemical results are shown in Figure 1.

β -catenin

Nuclear staining was present in 13/17 patients (17/21 lesions). There were differences between the glandular and squamous morular elements. In all but 1 case the staining was stronger and more extensive in squamous morules. Of 19 lesions with squamous morules, 4 were negative, 5 showed 3+ positivity, and 10 exhibited 4+ positivity. The glandular component was negative in 9 cases, 10 cases were 1+ positive, 1 case was 2+ positive, and 1 case was 3+ positive.

mTOR

The expression of mTOR could be assessed in 15/17 patients (19/21 lesions). Of all analyzed samples, 2 were negative. Positivity was restricted mostly to the glandular component. The intensity of staining was weak or moderate in 15 cases and strong in 2. Of 17 positive cases, 7 were classified as 4+, 5 as 3+, 4 as 2+, and 1 as 1+.

PTEN

The expression of PTEN could be assessed in 16/17 patients (19/21 samples). Of these samples, 6 (from 5 patients) were negative with only focal positivity in up to 5% tumor cells. Two lesions were classified as 1+, 4 as 2+, 5 as 3+, and 2 as 4+. The staining intensity was mostly weak or moderate. Normal endometrium was present in 10/21 samples. Diffuse PTEN expression

was found in all cases, weak to moderate in glands and moderate to strong in stromal cells.

GLUT1

The expression of GLUT1 could be assessed in all 17 patients (21 cases). All cases showed some degree of positivity. The expression differed between glandular and squamous morular components. The glandular component was positive in all but 1 case. In contrast, the squamous morular component was negative in 6/18 cases. Ten lesions showed the same or higher positivity in the squamous morular component compared with the glandular components. The glandular component was classified as: 1 case negative, 3 cases 1+, 9 cases 2+, 6 cases 3+, and 2 cases 4+. The squamous morular component was: 6 cases negative, 2 cases 1+, 7 cases 2+, 1 case 3+, and 2 cases 4+.

HNF-1 β

The nuclear expression of HNF-1 β was present mostly in the glandular component. Only 1 lesion was focally positive in <5% of the squamous morular component and was classified as negative. The staining intensity was usually weak or moderate. All but 5 cases were positive in the glandular component: 1 case 1+, 4 cases 2+, 6 cases 3+, and 5 cases 4+. In many cases, there was weak cytoplasmic staining that was regarded as nonspecific.

MMR Proteins (MLH-1, MSH-2, MSH-6, PMS-2)

Nuclear staining for the MMR proteins could be assessed in 18/21 cases for MLH-1 and MSH-2, 12/21 cases for PMS-2, and 10/21 cases for MSH-6. In 3 cases, there was no nuclear staining either in the lesion or in normal tissues with MLH-1, MSH-2, and MSH-6 and in 1 of these cases also with PMS-2; these cases were excluded from the analysis because of technical limitations. Two of these cases belonged to the group of recurrent/persistent lesions and showed positive staining in a subsequent biopsy. Of the analyzed cases, many nuclei were positive for the MMR proteins in all lesions. Staining was similar in the glandular and squamous morular elements.

p53 Protein

All cases exhibited weak nuclear positivity of scattered cells, in keeping with "wild-type" expression.

Molecular Analysis

The results of the molecular analysis are summarized in Table 2.

PTEN Gene

Numerical changes of the *PTEN* gene could be analyzed in all 21 samples. *PTEN* deletion was detected in 3 patients. In 1 of these patients, *PTEN* deletion detected by FISH was accompanied by loss of PTEN immunohistochemical expression. This patient had a recurrent/persistent lesion, and loss of PTEN expression accompanied by *PTEN* deletion was present in both the primary and recurrent/persistent lesion. In the other 2 patients, *PTEN* deletion

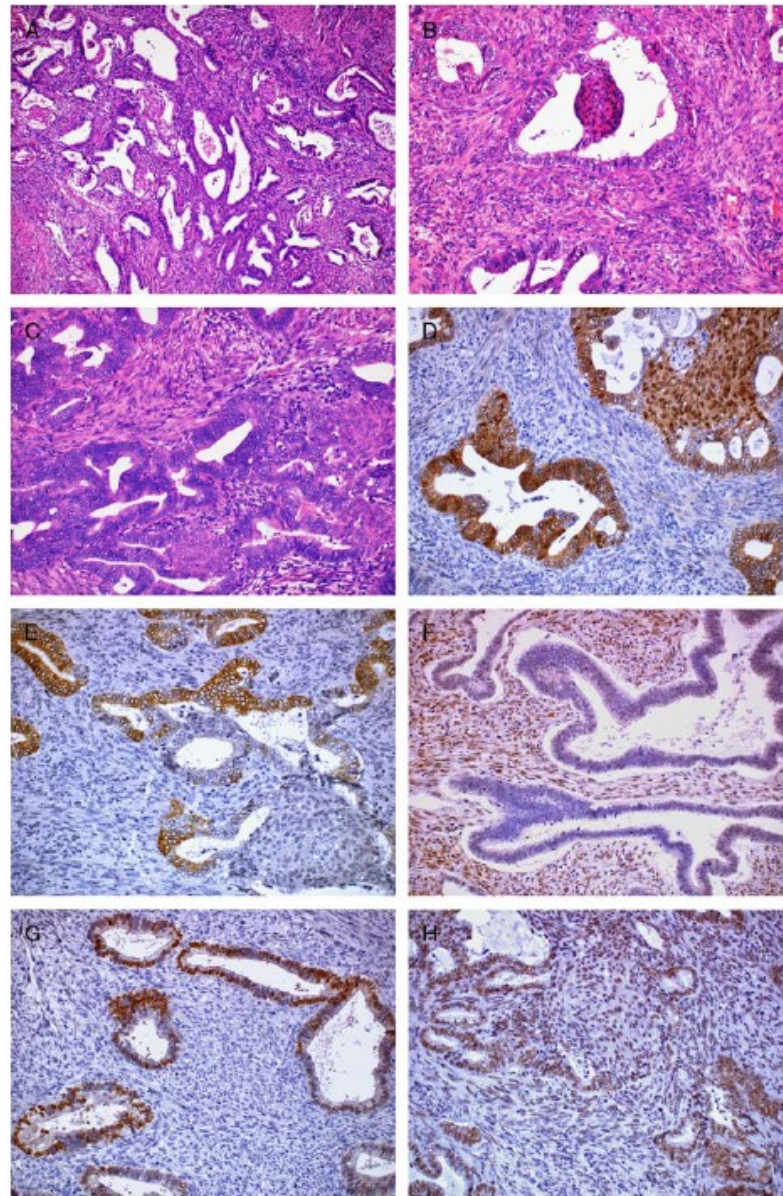


FIGURE 1. Morphologic and immunohistochemical features in cases of APA. A, Typical features of APA with haphazardly arranged irregular endometrioid-type glands (HE). B, Glands with squamous morule located within a fibromyomatous stroma (HE). C, Case with complex architectural pattern and moderate nuclear atypia (HE). D–H, Results of immunohistochemical staining showing nuclear expression of β -catenin mostly restricted to squamous morule (D); positivity of mTOR restricted to the glandular component (E); PTEN with negative glands and positivity in stromal cells (F); HNF-1 β with nuclear expression in some glandular cells (G) and nuclear expression of MLH-1 (H). HE indicates hematoxylin and eosin.

fibromuscular rather than usual "endometrial-type." If an endometrial glandular proliferation arises within this stroma, the stroma could in some way prevent the glandular proliferation spreading outside this region and therefore result in a localized polypoid lesion.

APA may be misdiagnosed as endometrial hyperplasia, including AH, because of the architecturally complex glands and the cytologic atypia. Typically, the glands in AH (and other endometrial hyperplasias) are surrounded by a dense proliferative endometrioid-type stroma, whereas in APA the stroma is leiomyomatous or fibromyofibromatous. APA may also be misdiagnosed as EC, including myoinvasive EC, especially on a curettage, biopsy, or polypectomy specimen. Marked cytologic atypia favors a myoinvasive adenocarcinoma, as, in APA, there is usually no more than mild to moderate cytologic atypia. The leiomyomatous or fibromyomatous stromal component of APA grows in short interlacing fascicles, in contrast to the elongated fibers of the normal myometrium. In curettages or biopsy from an APA, there are usually also fragments of normal background endometrium, and with an EC it would be unusual on biopsy to obtain only myoinvasive neoplasm without free tumor fragments.

APA is generally regarded as a benign lesion. However, in conservatively managed patients, treated by curettage or polypectomy, recurrence/persistence is common. In different studies, the rate varies but recurrence/persistence has been observed in up to 45% of cases.^{1,9-12} In our study, a recurrence/persistence developed in 6/13 (46%) patients with an available clinical history. In a meta-analysis of 136 cases of APA published in 2006, the recurrence/persistence rate was 30%.¹³ Moreover, this meta-analysis showed that APA not uncommonly coexists with endometrial hyperplasia and that 8.8% of APAs are associated with the development of EC. The hyperplasia or EC may involve the APA or the nonpolypoid endometrium. Other cases of APA coexisting with or preceding the development of EC have been reported.²⁻⁴ On the basis of these data, cases of APA should be carefully evaluated clinically and histologically, and this should not be regarded as an unequivocally benign lesion.¹⁴ Because of the fact that many patients with APA are in the reproductive age group, a request for fertility sparing management is common. However, patients with APA who wish to preserve fertility and are managed by local excision without hysterectomy should be carefully monitored and followed up.

Given the significant risk for recurrence/persistence after conservative management and the risk of development of AH and EC, it is important to know the underlying molecular events associated with APA. Only 2 small studies of 6 and 7 cases investigating the molecular events have been reported to date.^{5,6} The first study analyzed microsatellite instability (MSI) by polymerase chain reaction in 5 different microsatellite loci (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, and D17S250) and looked for *MLH-1* promoter hypermethylation and *CTNNB1* mutations.⁵ Immunohistochemistry for *MLH-1*, *MSH-2*, and β -cat-

enin was also performed. The results revealed *MLH-1* promoter hypermethylation in 2 cases and nuclear expression of β -catenin in 5. However, *CTNNB1* mutation was not found in any case. In contrast, in the second study, mutations of *CTNNB1* gene were detected in all 7 cases.⁶ The discrepant results could possibly be related to the fact that in the latter study the epithelial component was microdissected, and the samples were not "contaminated" by the stromal component. The second study that was concerned mainly with the assessment of proliferative activity showed overexpression of p21 and cyclin D1 in both the epithelial and stromal components.⁶ The authors concluded that APAs are lesions with decreased cell proliferation and that the activation of β -catenin signaling seems to be essential for the morular phenotype and the architectural features of the glandular component.

Given the paucity of information regarding the molecular events in APA, the goal of our study was to analyze molecular and immunohistochemical features in a large series of cases and to compare the results with the literature pertaining to AH and EC. The analyzed genes and proteins were selected because of the molecular alterations involved in the development of EC, which, as discussed, may be associated with APA.¹⁵⁻²⁴ Molecular changes occurring in type II endometrial carcinomas (the prototype of which is serous carcinoma) were not analyzed, except for *TP53*. We also examined the expression of some other markers, including GLUT1, mTOR, and HNF-1 β .

KRAS mutations have been implicated in the development of AH and EC. Mutations of this gene have been reported in about 20% of EC and some cases of AH.^{25,26} In our study, mutation of the *KRAS* gene was found in 4/16 (25%) patients. About 20% of ECs and some endometrial hyperplasias have been reported to be *BRAF* mutated.²⁷ However, in our study no *BRAF* mutations were found.

The majority of ECs have altered PTEN immunohistochemical expression, either reduced or complete absence. Mutation or loss of PTEN expression has been implicated as early markers of endometrial carcinogenesis, which also occurs in precursor lesions, and it was hypothesized that this can be used as a biomarker identifying lesions that are more likely to progress into a carcinoma.²⁸ However, later studies showed that loss of PTEN expression was found not only in lesions that progressed into a carcinoma but also in a similar percentage of lesions that did not progress, and ultimately the loss of PTEN expression has not proven to be useful as a progression marker.²⁹ Moreover, loss of PTEN expression can also be observed in normal endometrium, in both the secretory and proliferative phases.²⁸ In addition, it is well known that there is a relatively poor correlation between loss of PTEN protein expression and the presence of *PTEN* mutation.³⁰ This could be related to the occurrence of epigenetic changes that are not detectable by sequencing. In our study, loss of PTEN expression was identified in 5/16 patients. In 1 of these patients, the loss

of PTEN expression was accompanied by *PTEN* deletion detected by FISH. *PTEN* deletion occurred in 2 other cases in which immunohistochemical expression was maintained. This may be explained by the fact that *PTEN* deletion accompanied by loss of protein expression affects only some glands. It has been shown that PTEN phosphatase is a negative regulator of mTOR, and AH and EC are commonly associated with increased mTOR signaling.^{31,32} However, little is known about mTOR expression in endometrial lesions. In our study, phosphorylated (activated) mTOR expression was identified in 17/19 lesions.

MSI is found in about 25% to 30% of type I endometrial carcinomas.^{33–36} Most sporadic MSI endometrial carcinomas arise secondary to *MLH-1* promoter methylation, but a proportion have Lynch syndrome secondary to mutation in 1 of the MMR genes. It has been shown that in some patients with Lynch syndrome, MSI can be demonstrated in endometrial hyperplasia several years before the development of EC.³⁷ The expression of MMR proteins in normal endometrium, endometrial hyperplasias, and carcinomas has been evaluated in many studies.^{37–39} MSI and loss of MMR protein expression has been observed in a subset of EC, which frequently show lower uterine segment location, mucinous differentiation, intratumoral heterogeneity, undifferentiated/dedifferentiated morphology, and prominent lymphocytic infiltration.^{37,40–42} In our study, loss of MMR protein expression was not found in any case. Therefore, MSI is unlikely to occur in the development of APA, and this lesion is not likely to be a component of Lynch syndrome.

Mutations and epigenetic inactivation of *HNF-1 β* gene have been shown to be involved in the development of several tumors. Tumor cell lines with *HNF-1 β* mutation usually show loss of protein expression as detected by immunohistochemistry. In contrast, some tumors show upregulation of HNF-1 β , and strong expression of this protein is found in most clear cell carcinomas of the ovary and other sites in the female genital tract.^{43,44} However, this marker is not specific for clear cell carcinoma and can be expressed in other tumors including EC.⁴⁵ Regarding the expression of HNF-1 β in non-neoplastic tissues, studies have described positive staining in endometriosis and in normal endometrium, especially gestational or secretory endometrium.^{46,47} In our study, we found expression of HNF-1 β in the glandular component of APA in 16/21 samples. The expression of GLUT1 in normal and pathologic endometrium has been analyzed in only a few studies. Preferentially, the expression of this protein has been demonstrated in AH and EC, and this has been suggested as a surrogate marker for distinguishing between non-AH and AH.⁴⁸ However, in 1 study the authors identified GLUT1 expression in some cases of non-AH.^{49,50} In our study, we found GLUT1 expression in the glandular component of APA in 20/21 samples.

In summary, we have shown that APAs exhibit consistent immunohistochemical and molecular features, especially the nuclear expression of β -catenin in squamous morules, the expression of HNF-1 β , phosphory-

lated mTOR and GLUT1 in the glandular component, and “wild-type” p53 protein expression. Loss of PTEN expression and *KRAS* mutation also occurs in some cases. The immunophenotype and molecular events are similar to those found in AH and EC. On the basis of our results, and in agreement with previously published clinical and morphologic data, we believe that APA represents a lesion with an increased risk of developing AH and EC. Given the association with AH and EC and the shared immunohistochemical and molecular features, we feel that, conceptually, APA is best regarded as analogous to a localized form of AH.

REFERENCES

- Mazur MT. Atypical polypoid adenomyomas of the endometrium. *Am J Surg Pathol*. 1981;5:473–482.
- Fukunaga M, Endo Y, Ushigome S, et al. Atypical polypoid adenomyomas of the uterus. *Histopathology*. 1995;27:35–42.
- Nejkovic L, Pazin V, Filimonovic D. Atypical polypoid adenomyoma mixed with endometrioid carcinoma: a case report. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2013;34:101–103.
- Zhang HK, Chen WD. Atypical polypoid adenomyomas progressed to endometrial endometrioid adenocarcinomas. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;286:707–710.
- Ota S, Catus L, Matias-Guiu X, et al. Molecular pathology of atypical polypoid adenomyoma of the uterus. *Hum Pathol*. 2003;34:784–788.
- Takahashi H, Yoshida T, Matsumoto T, et al. Frequent beta-catenin gene mutations in atypical polypoid adenomyoma of the uterus. *Hum Pathol*. 2014;45:33–40.
- Kobel M, Reuss A, Du Bois A, et al. The biological and clinical value of p53 expression in pelvic high-grade serous carcinomas. *J Pathol*. 2010;222:191–198.
- McCluggage WG, Soslow RA, Gilks CB. Patterns of p53 immunoreactivity in endometrial carcinomas: “all or nothing” staining is of importance. *Histopathology*. 2011;59:786–788.
- Chen B, Zhu L, Lang JH. Atypical polypoid adenomyoma of the uterus: an analysis of 17 cases [in Chinese]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2012;92:1049–1051.
- Longacre TA, Chung MH, Rouse RV, et al. Atypical polypoid adenomyofibromas (atypical polypoid adenomyomas) of the uterus. A clinicopathologic study of 55 cases. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:1–20.
- Matsumoto T, Hiura M, Baba T, et al. Clinical management of atypical polypoid adenomyoma of the uterus. A clinicopathological review of 29 cases. *Gynecol Oncol*. 2013;129:54–57.
- Young RH, Treger T, Scully RE. Atypical polypoid adenomyoma of the uterus. A report of 27 cases. *Am J Clin Pathol*. 1986;86:139–145.
- Heatley MK. Atypical polypoid adenomyoma: a systematic review of the English literature. *Histopathology*. 2006;48:609–610.
- Jiang QY, Wang L, Wu RJ. A multiple perspectives on atypical polypoid adenomyoma of uterus. *Gynecol Endocrinol*. 2013;29:623–625.
- Briggs S, Tomlinson I. Germline and somatic polymerase epsilon and delta mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. *J Pathol*. 2013;230:148–153.
- Byron SA, Gartside M, Powell MA, et al. FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features. *PLoS One*. 2012;7:e30801.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497:67–73.
- Chmelarova M, Kos S, Dvorakova E, et al. Importance of promoter methylation of GATA4 and TP53 genes in endometrioid carcinoma of endometrium. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52:1229–1234.
- Dvorakova E, Chmelarova M, Laco J, et al. Methylation analysis of tumor suppressor genes in endometrioid carcinoma of endometrium using MS-MLPA. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2013;157:298–303.

20. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol*. 2006;24:4783–4791.
21. Lax SF, Kurman RJ. A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1997;81:228–232.
22. Matias-Guiu X, Prat J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology*. 2013;62:111–123.
23. Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, et al. Beta-catenin simultaneously induces activation of the p53-p21WAF1 pathway and overexpression of cyclin D1 during squamous differentiation of endometrial carcinoma cells. *Am J Pathol*. 2004;164:1739–1749.
24. Saegusa M, Okayasu I. Frequent nuclear beta-catenin accumulation and associated mutations in endometrioid-type endometrial and ovarian carcinomas with squamous differentiation. *J Pathol*. 2001;194:59–67.
25. Dobrzynka B, Terlikowski SJ, Mazurek A, et al. Mutations of the KRAS oncogene in endometrial hyperplasia and carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47:65–68.
26. Liu FS. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007;46:26–32.
27. Feng YZ, Shiozawa T, Miyamoto T, et al. BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. *Clin Cancer Res*. 2005;11:6133–6138.
28. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:924–930.
29. Lacey JV Jr, Mutter GL, Ronnett BM, et al. PTEN expression in endometrial biopsies as a marker of progression to endometrial carcinoma. *Cancer Res*. 2008;68:6014–6020.
30. Djordjevic B, Hennessy BT, Li J, et al. Clinical assessment of PTEN loss in endometrial carcinoma: immunohistochemistry outperforms gene sequencing. *Mod Pathol*. 2012;25:699–708.
31. Cheng H, Liu P, Zhang F, et al. A genetic mouse model of invasive endometrial cancer driven by concurrent loss of Pten and Lkb1 is highly responsive to mTOR inhibition. *Cancer Res*. 2014;74:15–23.
32. Ocana A, Vera-Badillo F, Al-Mubarak M, et al. Activation of the PI3K/mTOR/AKT pathway and survival in solid tumors: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9:e95219.
33. Hamid AA, Mandai M, Konishi I, et al. Cyclical change of hMSH2 protein expression in normal endometrium during the menstrual cycle and its overexpression in endometrial hyperplasia and sporadic endometrial carcinoma. *Cancer*. 2002;94:997–1005.
34. Hardisson D, Moreno-Bueno G, Sanchez L, et al. Tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair (hMLH1 and hMSH2 genes) in endometrial carcinoma and atypical endometrial hyperplasia: relationship with microsatellite instability. *Mod Pathol*. 2003;16:1148–1158.
35. Nieminen TT, Gylling A, Abdel-Rahman WM, et al. Molecular analysis of endometrial tumorigenesis: importance of complex hyperplasia regardless of atypia. *Clin Cancer Res*. 2009;15:5772–5783.
36. Orbo A, Nilsen MN, Arnes MS, et al. Loss of expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PTEN related to endometrial cancer in 68 patients with endometrial hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2003;22:141–148.
37. Peiro G, Diebold J, Lohse P, et al. Microsatellite instability, loss of heterozygosity, and loss of hMLH1 and hMSH2 protein expression in endometrial carcinoma. *Hum Pathol*. 2002;33:347–354.
38. Berends MJ, Hollema H, Wu Y, et al. MLH1 and MSH2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer. *Int J Cancer*. 2001;92:398–403.
39. Ichikawa Y, Lemon SJ, Wang S, et al. Microsatellite instability and expression of MLH1 and MSH2 in normal and malignant endometrial and ovarian epithelium in hereditary nonpolyposis colorectal cancer family members. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;112:2–8.
40. Folkens AK, Longacre TA. Hereditary gynaecological malignancies: advances in screening and treatment. *Histopathology*. 2013;62:2–30.
41. Garg K, Leitao MM Jr, Kauff ND, et al. Selection of endometrial carcinomas for DNA mismatch repair protein immunohistochemistry using patient age and tumor morphology enhances detection of mismatch repair abnormalities. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:925–933.
42. Garg K, Soslow RA. Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) and endometrial carcinoma. *J Clin Pathol*. 2009;62:679–684.
43. Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, et al. Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2003;163:2503–2512.
44. Hoang LN, Han G, McConechy M, et al. Immunohistochemical characterization of prototypical endometrial clear cell carcinoma—diagnostic utility of HNF-1beta and oestrogen receptor. *Histopathology*. 2014;64:585–596.
45. Fadare O, Liang SX. Diagnostic utility of hepatocyte nuclear factor 1-beta immunoreactivity in endometrial carcinomas: lack of specificity for endometrial clear cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20:580–587.
46. Kato N, Sasou S, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol*. 2006;19:83–89.
47. Wordley MJ, Welch WR, Berkowitz RS, et al. Endometriosis-associated ovarian cancer: a review of pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2013;14:5367–5379.
48. Wang BY, Kalir T, Sabo E, et al. Immunohistochemical staining of GLUT1 in benign, hyperplastic, and malignant endometrial epithelia. *Cancer*. 2000;88:2774–2781.
49. Ashton-Sager A, Paulino AF, Afify AM. GLUT-1 is preferentially expressed in atypical endometrial hyperplasia and endometrial adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006;14:187–192.
50. Krzeslak A, Wojcik-Krowiranda K, Forma E, et al. Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. *Pathol Oncol Res*. 2012;18:721–728.



Expression, Epigenetic and Genetic Changes of HNF1B in Endometrial Lesions

Kristýna Němejcová¹ · Ivana Tichá¹ · Petra Kleiblová^{2,3} · Michaela Bártů⁴ · David Cibula⁵ · Kateřina Jirsová⁶ · Pavel Dundr¹

Received: 28 October 2015 / Accepted: 15 December 2015
© Arányi Lajos Foundation 2015

Abstract Hepatocyte nuclear factor 1-beta (HNF-1-beta) is a transcription factor involved in cancerogenesis of various tumors, including endometrioid carcinoma. We performed comprehensive analysis of HNF-1-beta in lesions of the endometrium, including protein expression and genetic and epigenetic changes. Expression of HNF-1-beta was analyzed immunohistochemically in 320 cases including both tumor and non-tumor endometrial lesions. Promoter methylation and genetic variants were evaluated, using bisulphite and direct sequencing, in 30 (18 fresh frozen, 12 FFPE tumors) endometrioid carcinomas (ECs) and 15 ovarian clear cell carcinomas (OCCCs) as a control group. We detected expression of HNF-1-beta in 28 % of ECs (51/180 cases), 26 % of serous carcinoma (7/27 cases),

83 % of endometrial clear cell carcinoma (15/18 cases), 93 % of hyperplastic polyps with atypias (13/14 cases), 100 % of hyperplastic polyps without atypias (16/16 cases), 88 % of hyperplasias with atypias (14/16 cases), 91 % of hyperplasias without atypias (10/11 cases), and in ≥80 % of different normal endometrium samples. The control group of OCCCs showed HNF-1-beta expression in 95 % (18/19 cases). Methylation in promoter region was detected in 13.3 % (4/30) of ECs, but not in corresponding normal tissue where available, nor in OCCCs (0/15 cases). Mutation analysis revealed truncating variant c.454C > T (p.Gln152X) in one EC and missense variant c.848C > T (p.Ala283Val) was detected in one OCCC. In conclusion, expression of HNF-1-beta was detected in various extents in all types of lesions analyzed, nevertheless its strong expression was mostly limited to clear cell carcinomas. Biological significance of genetic and epigenetic changes needs further investigation.

✉ Pavel Dundr
pdundr@seznam.cz

Keywords Clear cell carcinoma · Endometrioid carcinoma · HNF-1-beta · Immunohistochemistry · Mutation analysis · Methylation

¹ Department of Pathology, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University in Prague, Studnickova 2, 2 12800 Prague, Czech Republic

² Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, General University Hospital, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

³ Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, General University Hospital in Prague, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁴ First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁵ Gynecologic Oncology Center, Department of Obstetrics and Gynecology, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University in Prague, Studnickova 2, 2 12800 Prague, Czech Republic

⁶ Bank of Biological Material, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Introduction

Hepatocyte nuclear factor 1-beta (HNF-1-beta protein is coded by the *HNF1B* gene, also known as *TCF2*) is a transcription factor that plays a crucial role during ontogenesis in the differentiation of visceral endoderm from primitive endoderm [1, 2]. The gene is located at chromosome 17q12, comprises 9 coding exons that spans around 60 kb (MIM#189,907) and encodes four protein isoforms (designated as A, B, C and 4) [3, 4]. The longest A isoform is 557 amino acid (aa) protein that contains a dimerization domain, aa 1–31, and a DNA binding domain,

aa 231–311 (UniProt P35680; <http://www.uniprot.org>). The B isoform, comparing to A, lacks aa 183–208. The C isoform differs in structure from A in aa 350–400, and in the C terminus aa 401–557 are missing [3, 4]. A and B isoforms are regarded as transcription activators, whereas the C isoform is probably a transcription repressor [3]. HNF-1-beta protein regulates expression of multiple genes involved in cell cycle modulation, susceptibility to apoptosis, and glucose metabolism [5–7]. Hereditary mutations in the *HNF1B* gene are associated with a number of diseases associated with defects in kidney development and a complex syndrome known as renal cysts and diabetes (RCAD) [8, 9]. Expression of the HNF-1-beta protein is altered in several tumor types, with both down- or up-regulations described based on the tumor type. There can also be changes in isoform expressions in benign and malignant conditions [10]. Moreover, genetic and epigenetic changes of *HNF1B* also play role in tumorigenesis. However, only few studies have analyzed epigenetic changes of *HNF1B* in female genital tract tumors and only 6 somatic genetic variants (2 silent, 3 missense and 1 frameshift) were described in a group of 514 endometrioid carcinomas as a part of the large study “Uterine Corpus Endometrioid Carcinoma (TCGA, US) import from ICGC” (Cosmic database; accessed October 2015; <http://www.sanger.ac.uk/cosmic>) [11, 12]. Immunohistochemical expression of HNF-1-beta was considered as a marker of clear cell carcinomas (CCCs) [5]. However, recent studies have shown that this marker is not entirely specific and its expression can be found in tumors of other histogenesis and also in some non-tumor lesions and normal endometrium [13–21]. In our study, we focused on comprehensive analysis of HNF-1-beta expression in various endometrial lesions and in normal endometrium. Moreover, we analyzed genetic variations of the *HNF1B* coding region and methylation of the promoter region in selected cases of endometrioid carcinoma and ovarian clear cell carcinoma (OCCC) and compared these findings with immunohistochemical results.

Material and Methods

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks were obtained from the archive files of our department. Fresh frozen tissue samples were from Bank of Biological Material (BBM) of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague. Histologic review of the hematoxylin and eosin-stained slides was performed in all cases.

In total, 339 FFPE specimens was selected for immunohistochemical analysis, comprising of 320 endometrial lesions; 180 endometrioid carcinomas (77 well differentiated, 73 moderately differentiated, and 30 poorly differentiated), 27 serous carcinomas, 18 endometrial CCC, 14 hyperplastic polyps with atypias, 16 hyperplastic polyps without atypias, 16 hyperplasias

with atypias, 11 hyperplasias without atypias, 38 samples from normal endometrium (18 proliferative endometrium, 15 secretory endometrium, and 5 atrophic endometrium); and as control 19 OCCC.

Promoter methylation and gene mutations were examined in 33 cases of endometrioid carcinoma (15 FFPE and 18 fresh frozen (FF) tumors), 15 FF corresponding normal non-tumor tissues and 19 FFPE samples of OCCC. We were able to isolate DNA of sufficient quality for molecular analysis from all fresh frozen tissues and from 12/15 (80 %) FFPE endometrioid carcinoma samples. Regarding OCCC FFPE samples, DNA of sufficient quality was obtained from 15/19 (79 %) cases for methylation analysis and 12/19 (63 %) cases for mutation analysis of whole coding region. Both, methylation and mutation analyses were successful in 10/15 endometrioid carcinomas and 12/19 OCCCs.

In compliance with the Helsinki Declaration, the project has been approved by Ethics Committee of General University Hospital in Prague.

Immunohistochemical Analysis

Immunohistochemical analysis was performed using the avidin-biotin complex method with antibody against the HNF-1-beta (polyclonal, dilution 1:500, Sigma-Aldrich, Prestige Antibodies, St. Louis, United States). Immunohistochemical results were assessed semi-quantitatively and graded on a four-tier scale based on the percentage of positive cells: 0 = <5 %; 1+ = 5–29 %; 2+ = 30–59 %; 3+ = >60 %. Only nuclear staining was regarded as positive. Moreover, the staining intensity of HNF-1-beta was assessed as weak, moderate or strong.

Statistical Analyses

Software R (<https://www.r-project.org/>) was used to perform Fisher exact test in order to compare different tumor groups based on the immunohistochemical staining intensity or the percentage of positive staining cells. All tests were two sided, and a *P*-value less than 0.05 was considered as significant.

Screening for Genetic and Epigenetic Alterations

Methylation status in promoter region and mutations in coding region and exon-intron boundaries of *HNF1B* were screened. DNA was extracted by using standard procedures implementing GeneRead™ DNA FFPE kit or QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA was quantified fluorometrically by using dsDNA BR Assay Kit and Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Bisulfite modification was analyzed by using EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's instructions,

followed by sequencing. Experiments included two controls, non-methylated DNA and universally methylated DNA (Human HCT116 DKO Non-Methylated DNA and Human HCT116 DKO Methylated DNA; Zymo Research). Primers used for PCR amplification of promoter region and bisulphite sequencing of modified DNA (Table 1) were designed by using software <http://www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker>. Primers for mutation analysis (Table 1) in the exons 1 to 9 and adjacent intron sequences were used for PCR reaction and direct Sanger sequencing. DNA regions of interest were amplified using 5× HOT FirePol EvaGreen HRM Mix NO ROX (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) according to the manufacturer's instructions and analyzed by HRMA (High Resolution Melting Analysis). BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) was used for sequencing reaction and separation was performed on ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems). Mutations were detected by both forward and reverse primer. Suspicious fragments were

verified by another independent PCR amplification and sequence analysis.

NCBI Reference sequence of the *HNF1B* gene (alternatively TCF2) is NM_000458.3. Promoter region 95–695 bp upstream ATG (start codon) was defined as putative promoter region according RefSeq (Based on UCSC/NCBI Assembly, NCBI Build 35, UCSC Version 17). Nomenclature of variants follow recommendations by the Human Genome Variation Society (HGVS). Mutations which were not found until October 2015 in the literature, the Single Nucleotide Polymorphism Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), the 1000 Genomes Database (<http://www.1000genomes.org/>), in Exome Sequencing Project (ESP; <http://varianttools.sourceforge.net/Annotation/EVS>), or in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (<http://www.sanger.ac.uk/cosmic>) were considered as novel [22]. To evaluate the predicted effects of missense variants on protein biological function and stability, in silico prediction tools were used: PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), Mutation

Table 1 Primer pairs used for PCR amplification and sequence analysis of the *HNF1B* gene

Exon	Name	Primers 5' -> 3'	bp	Amplicon [bp]
Primers for methylation analysis in promoter region				
	HNF1B_mp2F	TTAGGTTGTAAGGTATTGGTTTAATAAGTTTAAAGG	36	160
	HNF1B_mp2R	AAACAAACCTAAAAACAAAAACCTAAACC	31	
Primers for mutation analysis of coding region (* long exons were divided in two overlapping amplicons)				
*1	HNF1B_01f	TGCTTGTGAAACTCCCCTCCAC	22	277
	HNF1B_02r	TGGTGAGAGTATGGAAGACCGGC	23	
1	HNF1B_03f	TTGCTGCCATCCCCGAACTTC	21	274
	HNF1B_04r	TCCCCTCCACCTCGCTCTG	19	
2	HNF1B_05f	CCCCAGATGTCCTCCACTAGTACC	24	287
	HNF1B_06r	CACTTGAGTTGAGGCAGAGGC	22	
*3	HNF1B_07f	GGTGTCTTCGTCGTTGTCTGTC	23	258
	HNF1B_08r	ATTGAAACCGTTGCCGCG	19	
3	HNF1B_09f	GTCAACAGAGCCATGGGCCTG	21	234
	HNF1B_10r	TCCTGGGTCTGTGTACTTGCCC	22	
*4	HNF1B_11f	CTGCTGTGATTGTGTGTTTGGCC	25	245
	HNF1B_12r	AGTCTGGTTGGAGCTATAGGCGTC	24	
4	HNF1B_13f	TGCAAAACCGCAGGAAGGAGG	22	270
	HNF1B_14r	GAGAGCGGCCCTAGGATCATCTC	23	
5	HNF1B_15f	CAGGACCCTGGTGGCACTAATG	22	246
	HNF1B_16r	AGCTCCAGAGCGACAATGGC	20	
6	HNF1B_17f	GGAAACTGCTCTTGTGGTCCAAGTC	26	241
	HNF1B_18r	TCTTCTTCCCTGCCCAAG	22	
7	HNF1B_19f	CTCCTTATCCCAGGAGCTGTCTGTG	25	290
	HNF1B_20r	ACTGAGGTCCTGAGTGCTCC	21	
8	HNF1B_21f	GCCTGTGTATGCACCTTGATTCTG	24	226
	HNF1B_22r	CACATCCATGGCCTTATCACACC	24	
9	HNF1B_23f	AATGACACAGCTGAGCACCCCTC	22	172
	HNF1B_24r	CTCGCAGGTGCTGGTCAGG	19	

Taster (<http://www.mutationtaster.org>), and MUpro (<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu>).

Results

Immunohistochemical Findings

All the results are summarized in Table 2. Figure 1 shows representative examples of the HNF-1-beta expression in various endometrial lesions.

The group of all CCCs in comparison with the tumors of different histogenesis showed significant difference in the HNF-1-beta expression based on the intensity ($p < 0.001$) as well as the extension of staining ($p < 0.001$) when comparing CCCs with serous carcinomas and comparing CCC with endometrioid carcinomas (EC).

Expression of HNF-1-beta was found in 33/37 (89 %) of all CCCs (18/19 [95 %] ovarian and 15/18 [83 %] endometrial). Fourteen cases OCCCs were 3+ positive, four cases showed 2+ positivity, and only one case was negative. From the group of endometrial CCCs there were eleven cases 3+ positive, two were 2+ positive, two were positive only focally 1+, and three were negative. The intensity of staining was in all HNF-1-beta positive CCCs strong, with the exception of 1 case of endometrial tumor, which showed weak staining in about 7 % of the tumor cells (1+).

ECs showed positivity of HNF-1-beta in 25/77 (32 %) of well differentiated tumors, 24/73 (33 %) of moderately differentiated tumors, and 2/30 (7 %) of poorly differentiated tumors. In total, 51/180 (28 %) ECs were HNF-1-beta positive. Nine ECs were 3+, 14 were 2+, and 28 were 1+ positive. The staining intensity was usually weak, only five cases showed moderate intensity. No EC demonstrated strong HNF-1-beta expression.

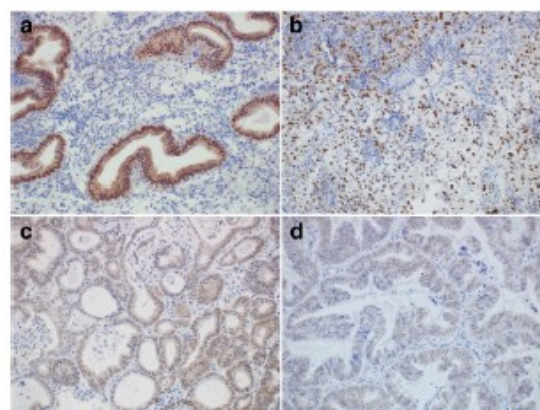


Fig. 1 HNF-1 beta expression in endometrial lesions. Strong HNF-1 beta expression in normal secretory endometrium (1a, 400 \times) and clear cell carcinoma (1b, 200 \times). Staining of moderate intensity in grade 1 endometrioid carcinoma (1c, 400 \times). Weak nuclear staining in grade 1 endometrioid carcinoma (1d, 400 \times). Note the nonspecific cytoplasmic staining in some cases

Serous carcinomas were HNF-1-beta positive in 7/27 cases (26%). 2 cases were 1+ positive, 5 cases showed 3+ positivity. The intensity of staining was weak in three cases, moderate in three cases and strong in one case.

All 16 hyperplastic polyps without atypias and 13/14 (93 %) hyperplastic polyps with atypias were HNF-1-beta positive: 4 cases 2+, 12 cases 3+; and 3 cases 1+, 5 cases 2+, 5 cases 3+, respectively. The intensity of staining was mostly weak or moderate.

Weak or moderate intensity of HNF-1-beta was found in 10/11 (91 %) hyperplasias without atypias (2 cases 1+, 3 cases 2+, 5 cases 3+) and in 14/16 (88 %) of hyperplasias with atypias (8 cases 1+, 2 cases 2+, 4 cases 3+).

Samples from normal endometrium showed positivity of HNF-1-beta in 16/18 (89 %) of proliferative endometrium

Table 2 Summary of immunohistochemical results

HNF1B	OCCC	CCCE	SC	EC			HPA	HP	HA	H	Normal endom.		
				G1	G2	G3					Sec.	Pro.	At.
Total	19	18	27	77	73	30	14	16	16	11	15	18	5
Positive	18	15	7	25	24	2	13	16	14	10	15	16	4
3+	14	11	5	3	4	2	5	12	4	5	13	11	4
2+	4	2	0	7	7	0	5	4	2	3	1	4	0
1+	0	2	2	15	13	0	3	0	8	2	1	1	0
Negative	1	3	20	52	49	28	1	0	2	1	0	2	1

OCCC Ovarian clear cell carcinomas, CCCE Endometrial clear cell carcinomas, SC Serous carcinomas of endometrium, EC Endometrioid carcinomas, HPA Hyperplastic polyps with atypias, HP Hyperplastic polyps without atypias, HA Hyperplasias with atypias, H Hyperplasias without atypias, Normal endom. Normal endometrium, Sec. Secretory, Pro. Proliferative, At. Atrophic, G1 Well differentiated, G2 Moderately differentiated, G3 Poorly differentiated carcinomas. Immunohistochemical results were assessed semi-quantitatively and graded on a four-tier scale based on the percentage of positive cells: 0 = <5 %; 1+ = 5–29 %; 2+ = 30–59 %; 3+ = >60 %

(1 case 1+, 4 cases 2+, 11 cases 3+), in all 15 cases of secretory endometrium (1 case 1+, 1 case 2+, 13 cases 3+), and in 4/5 (80 %) of atrophic endometrium (4 cases 3+). Intensity of staining in proliferative endometrium was weak in 10 cases and moderate in 8 cases. In secretory endometrium the intensity of staining was mostly moderate or strong, except of two cases which showed only weak intensity. In all cases of atrophic endometrium the intensity of staining was weak.

Genetic and Epigenetic Changes of the *HNF1B* Gene

Epigenetic Analysis

Gold standard method employing bisulphite modification of DNA followed by PCR amplification and direct sequencing of target area was used for the analysis of DNA methylation. We assessed DNA methylation in a part of the promoter region that spans 3 CpG islands (Fig. 2). Methylation in promoter region was detected in 4/30 (13.3 %) ECs, but not in 3 available corresponding normal tissues. Compared to EC, no case of promoter methylation was found in 15 cases of OCCC examined.

Mutation Analysis

Direct DNA sequence analysis of the *HNF1B* gene demonstrates 4 different single nucleotide variants in 4 ECs (one nonsense variant in exon 2, c.454C > T, p.Gln152X; Fig. 3; one silent variant in exon 3, c.585C > T, p.Asp195; two noncoding variants in intron 2 and intron 3, flanking exon 3: c.545-25C > T and c.809 + 27C > T), and one missense variant in exon 4 (c.848C > T, p.Ala283Val) in OCCC. All 3 exon variants were heterozygous transitions C > T, except mutation p.Gln152X where the major variant was mutant allele T. All variants have been reported for the first time. Non-tumor tissue was not available to confirm somatic status of the variant. Truncating mutation p.Gln152X leads to a shorter dysfunctional protein

and is generally considered as pathogenic, and p.Ala283Val was evaluated by in silico model as deleterious (Table 3).

Discussion

HNF-1-beta is a transcription factor which plays an essential role during ontogenesis and seems to be involved in cancerogenesis of various tumors, including endometrioid carcinoma [1, 2, 23–25]. As indicated by recent genome-wide association studies, common genetic variants of this gene are associated with risk of type II diabetes and either increased or decreased risk of several cancers including endometrioid endometrial carcinoma and serous ovarian carcinoma [7, 11, 26–29]. However, the exact mechanism by which *HNF1B* participates in the process of cancerogenesis is unknown and probably differs in various types of tumors.

In one study, knock-down of *HNF1B* in OCCC led to the induction of apoptosis [5]. This correlates with results of a recent study which has shown that upregulation of *HNF1B* by inflammatory cytokine NF- κ B/p53 decreases OCCC susceptibility to apoptosis [6].

Regarding the fact that *HNF1B* can be either down-regulated or up-regulated, *HNF1B* can probably serve as either a tumor suppressor gene or an oncogene in different cancers. It has been shown that down-regulation of *HNF1B* in clear-cell renal cell carcinoma and prostate carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis [24, 30]. A different situation is present in OCCC. The promoter of *HNF1B* in OCCC is typically unmethylated and gene expression is increased compared with other ovarian cancer types [5, 11]. This corresponds to our data. We have not identified any methylated case in the control group of 15 OCCCs. On the contrary, methylation of *HNF1B* gene promoter was detected in 4/30 EC samples (in 1/12 FFPE and 3/18 fresh frozen tumors). The corresponding non-tumor tissue available in 15/18 fresh frozen patients was unmethylated. Methylation of the *HNF1B* gene promoter was found in some cancer cell lines derived from pancreatic, colorectal, gastric, and ovarian tumors [12]. DNA methylation is typically associated with the silencing of the gene expression. In our study, it was not possible to correlate *HNF1B* genetic and epigenetic variations with expression pattern of HNF-1-beta because of a small sample set. Nevertheless, we observed in all 4 cases weak or negative HNF-1-beta staining with methylated promoter, while stronger expression was detected in the group with unmethylated promoter.

Surprisingly, despite the growing knowledge about the importance of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *HNF1B* in several cancer types, little is known about mutations of this gene in various tumors, except for some germline mutations associated with kidney cancer [31]. In our study, screening of genetic variants in the whole coding region

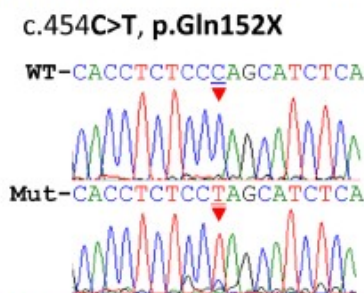
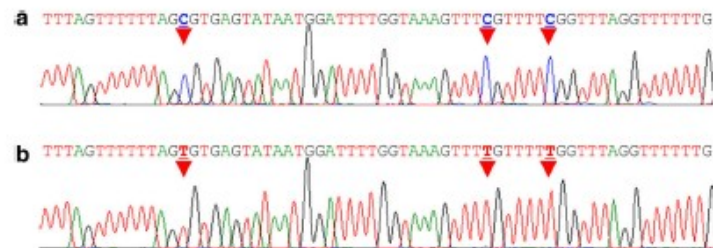


Fig. 2 Bisulfite sequence electropherograms. Fragments show methylation status in three CpG sites from *HNF1B* promoter. Representative electropherograms of (a) methylated, and (b) non-methylated are shown. Sodium bisulfite deaminates cytosine into uracil but does not affect 5-methylcytosine. Uracils are detected as thymines after PCR and sequencing reaction. Triangles point cytosins in CpG islands

Fig. 3 Novel frame-shift mutation of *HNF1B*. Comparison between wild type (WT) and mutated (Mut) sequence. Changed nucleotide is indicated by a triangle



revealed 4 sequence variants in 30 ECs and one missense variant among 12 OCCCs. Nonsense mutation (p.Gln152X) identified in one EC leads to premature translation termination resulting to the aberrant protein formation. This truncated protein has retained epitope detected by our antibody which can explain detection of HNF-1-beta expression. Mutation detected in one OCCC case was missense variant leading to exchange of amino acid Alanine to Valine at the position 283 (p.Ala283Val). This variant affects DNA binding domain (amino acids 231–311) which suggests that this variant affects crucial function of the protein. High probability of damaging effect of this mutation was suggested also by in silico predictive model.

Regarding protein expression, HNF-1-beta was identified in 2003 as the first positive relatively specific immunohistochemical marker of CCC [5]. Since that, expression of HNF-1-beta in non-neoplastic tissue and neoplasms of the female genital tract was analyzed in few studies [13–18]. These studies have analyzed HNF-1-beta expression in endometriosis, normal endometrium, lesions and tumors of cervix and ovary. Most of the early studies found that expression of HNF-1-beta is mostly restricted to CCC [5, 14–16]. However, more recent studies have described HNF-1-beta expression not only in CCC but also in other tumor types including serous, endometrioid, and mucinous carcinomas and most types of borderline tumors [17, 19–21]. We and others have recently described expression of HNF-1-beta in cervical adenocarcinomas and we have also described its expression in atypical polypoid adenomyomas of the uterus [32, 33]. Other recent studies have found expression of HNF-1-beta in some cases of endometriosis and in normal endometrium, especially in the secretory phase or gestational state [13, 14]. The results of our study are in concordance with other recent studies, which have

shown that HNF-1-beta is not a specific marker of CCC and can be commonly found in other non-tumor and tumor lesions. However, among tumors, strong expression of HNF-1-beta was in our study found only in CCC, with exception of one case of endometrial serous carcinoma. Moreover, we observed different HNF-1-beta expression in ECs depending on differentiation of tumor. ECs with poor differentiation seldom express HNF-1-beta compared with ECs with well or moderate differentiation.

Despite the fact that HNF-1-beta is a relatively sensitive marker of CCC, specificity is lower than previously thought. For example, in a recent study of ovarian and uterine ECs, ECs with clear cell change and CCC, the authors found sensitivity of HNF-1-beta similar as for Napsin A, but the specificity was lower (55.9 % vs. 93 %) [34]. Another recent study analyzed expression of HNF-1-beta, Napsin A, and AMACR in 279 ovarian carcinomas [35]. HNF-1-beta and Napsin A were expressed in 92 % and 82 % of OCCCs, 7 % and 1 % of serous carcinoma, 37 % and 5.3 % of EC, 60 % and 0 % of mucinous tumors, and 100 % and 0 % of yolk sac tumors, respectively. HNF-1-beta expression in 45 endometrial carcinomas has also been assessed in another study analyzing 15 cases each from CCC, serous carcinoma and EC, respectively [25]. In their study, strong expression of HNF-1-beta was found in 100 % of CCC. Three out of 15 cases of EC (grade 3) showed expression in >25 % of tumor cells (50 % tumor cells, weak to moderate intensity). Five serous carcinomas were completely HNF-1-beta negative, 4 showed focal positivity in <25 % of tumor cells, and 6 cases showed strong positivity.

In conclusion, we performed comprehensive analysis of HNF-1-beta in normal endometrium and in various endometrial lesions, including its immunohistochemical expression

Table 3 *In silico* prediction of pathogenicity. Prediction analysis of identified novel variants in the *HNF1B* gene

Exon	Mutation designation*	Predicted effect on protein	Mutation Taster	PolyPhen-2	MUpro
2	c.454C > T	p.Q152X	Disease causing	NA	NA
4	c.848C > T	p.A283V	Disease causing	Probably damaging	Decrease stability

* GenBank Reference Sequence: NM_000458.3: +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon. NA – in silico prediction tool is not applicable for nonsense mutations

and analysis of epigenetic and genetic changes. Immunohistochemical analysis of HNF-1-beta expression can be of use in the differential diagnosis of female genital tract tumors. We should be aware of some limitations, especially its low specificity for CCC. However, if we consider the character of staining, strong expression of HNF-1-beta was found in our study, with one exception, only in a group of CCCs. Further, molecular analysis revealed relatively common (13.3 %) methylation of the *HNF1B* promotor in EC compared to the unmethylated *HNF1B* promotor in OCCC. We have also found nonsense heterozygous mutations of *HNF1B* in 1 case of EC. Four other single nucleotide variants were identified, 3 of them in ECs (one silent variant in exon 3, and two noncoding variants in intron 2 and intron 3) and one in OCCC (missense variant in exon 4). However, regarding genetic and epigenetic changes, we are well aware of the limitations of our study because of small cohort of cases. The precise role of *HNF1B* in carcinogenesis as well as the importance of molecular targeting of the HNF-1-beta protein for therapeutic purposes remain unknown and require additional studies.

Acknowledgments This work was supported by Ministry of Health, Czech Republic (IGA MZ CR project NT14001-3/2013 and RVO-VFN 64165), by Charles University in Prague (Project PRVOUK-P27/LF1/1, UNCE 204024, and SVV UK 260148/2015), by Bank of Biological Material project BBM LM2010004, and by OPBK (Research Laboratory of Tumor Diseases, CZ.2.16/3.1.00/24509).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Barbacci E, Chalkiadaki A, Masdeu C, et al. (2004) HNF1 β /TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum Mol Genet* 13:3139–3149
- Cereghini S (1996) Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* 10:267–282
- Bach I, Yaniv M (1993) More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J* 12:4229–4242 Erratum in: *EMBO J* 1994 13:492
- Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, et al. (1997) Mutation in hepatocyte nuclear factor-1-beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 17:384–385
- Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, et al. (2003) Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 β as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 163: 2503–2512
- Suzuki E, Kajita S, Takahashi H, Matsumoto T, Tsuruta T, Saegusa M (2015) Transcriptional upregulation of HNF-1 β by NF- κ B in ovarian clear cell carcinoma modulates susceptibility to apoptosis through alteration in bcl-2 expression. *Lab Invest* 95:962–972. doi:10.1038/labinvest.2015.73
- Pontoglio M (2000) Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 16:140–143
- Bellanné-Chantelot C, Chauveau D, Gautier JF, et al. (2004) Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1 β mutations. *Ann Intern Med* 140:510–517
- Lokmane L, Haumaitre C, Garcia-Villalba P, Anselme I, Schneider-Maunoury S, Cereghini S (2008) Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development* 135:2777–2786. doi:10.1242/dev.023010
- Harries LW, Perry JR, McCullagh P, Crundwell M (2010) Alterations in LMTK2, MSMB and HNF1B gene expression are associated with the development of prostate cancer. *BMC Cancer* 10:315. doi:10.1186/1471-2407-10-315
- Shen H, Fridley BL, Song H, et al. (2013) Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer. *Nat Commun* 4:1628. doi:10.1038/ncomms2629
- Terasawa K, Toyota M, Sagae S, et al. (2006) Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines. *Br J Cancer* 94:914–921
- Kato N, Motoyama T (2009) Hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in human urogenital organs: its expression and role in embryogenesis and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 24:1479–1486
- Yamamoto S, Tsuda H, Aida S, Shimazaki H, Tamai S, Matsubara O (2007) Immunohistochemical detection of hepatocyte nuclear factor 1 β in ovarian and endometrial clear-cell adenocarcinomas and nonneoplastic endometrium. *Hum Pathol* 38:1074–1080
- Kato N, Sasou S, Motoyama T (2006) Expression of hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol* 19:83–89
- Kato N, Tamura G, Motoyama T (2008) Hypomethylation of hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) CpG island in clear cell carcinoma of the ovary. *Virchows Arch* 452:175–180
- Park KJ, Kiyokawa T, Soslow RA, Lamb CA, Oliva E, Zivanovic O, Juretzka MM, Pirog EC (2011) Unusual endocervical adenocarcinomas: an immunohistochemical analysis with molecular detection of human papillomavirus. *Am J Surg Pathol* 35:633–646. doi:10.1097/PAS.0b013e31821534b9
- Kenny SL, McBride HA, Jamison J, McCluggage WG (2012) Mesonephric adenocarcinomas of the uterine cervix and corpus: HPV-negative neoplasms that are commonly PAX8, CA125, and HMGA2 positive and that may be immunoreactive with TTF1 and hepatocyte nuclear factor 1- β . *Am J Surg Pathol* 36:799–807. doi:10.1097/PAS.0b013e31824a72c6
- Fadare O, Liang SX (2012) Diagnostic utility of hepatocyte nuclear factor 1-beta immunoreactivity in endometrial carcinomas: lack of specificity for endometrial clear cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 20:580–587. doi:10.1097/PAL.0b013e31824973d1
- Kalloger SE, Köbel M, Leung S, et al. (2011) Calculator for ovarian carcinoma subtype prediction. *Mod Pathol* 24:512–521. doi:10.1038/modpathol.2010.215
- Tomassetti A, De Santis G, Castellano G, Miotti S, Mazzi M, Tomasoni D, Van Roy F, Carcangiu ML, Canevari S (2008) Variant HNF1 modulates epithelial plasticity of normal and transformed ovary cells. *Neoplasia* 10:1481–1492
- Forbes SA, Bindal N, Bamford S, et al. (2011) COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 39(Database issue):D945–D950. doi:10.1093/nar/gkq929
- Kim L, Liao J, Zhang M, Talamonti M, Bentrem D, Rao S, Yang GY (2008) Clear cell carcinoma of the pancreas: histopathologic features and a unique biomarker: hepatocyte nuclear factor-1beta. *Mod Pathol* 21:1075–1083. doi:10.1038/modpathol.2008.95

24. Buchner A, Castro M, Hennig A, Popp T, Assmann G, Stief CG, Zimmermann W (2010) Downregulation of HNF-1B in renal cell carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis. *Urology* 76:507e6–50711. doi:10.1016/j.urology.2010.03.042
25. Hoang LN, Han G, McConechy M, et al. (2014) Immunohistochemical characterization of prototypical endometrial clear cell carcinoma—diagnostic utility of HNF-1 β and oestrogen receptor. *Histopathology* 64: 585–596. doi:10.1111/his.12286
26. Painter JN, O'Mara TA, Batra J, et al. (2015) Fine-mapping of the HNF1B multicancer locus identifies candidate variants that mediate endometrial cancer risk. *Hum Mol Genet* 24:1478–1492. doi:10.1093/hmg/ddu552
27. Spurdle AB, Thompson DJ, Ahmed S, et al. (2011) Genome-wide association study identifies a common variant associated with risk of endometrial cancer. *Nat Genet* 43:451–454. doi:10.1038/ng.812
28. Mandato VD, Farnetti E, Torricelli F, et al. (2015) HNF1B polymorphism influence the prognosis of endometrial cancer patients: a cohort study. *BMC Cancer* 15:229. doi:10.1186/s12885-015-1246-5
29. Pharoah PD, Tsai YY, Ramus SJ, et al. (2013) GWAS meta-analysis and replication identifies three new susceptibility loci for ovarian cancer. *Nat Genet* 45:362–370. doi:10.1038/ng.2564
30. Noto H, Osame K, Sasazuki T, Noda M (2010) Substantially increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic evidence in Japan. *J Diabetes Complicat* 24:345–353. doi:10.1016/j.jdiacomp.2010.06.004
31. Rebouissou S, Vasiliu V, Thomas C, et al. (2005) Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas. *Hum Mol Genet* 14:603–614
32. Němejcová K, Cibula D, Dunder P (2015) Expression of HNF-1 β in cervical carcinomas: an immunohistochemical study of 155 cases. *Diagn Pathol* 10:8. doi:10.1186/s13000-015-0245-9
33. Němejcová K, Kenny SL, Laco J, et al. (2015) Atypical Polypoid Adenomyoma of the Uterus: An Immunohistochemical and Molecular Study of 21 Cases. *Am J Surg Pathol* 39:1148–1155. doi:10.1097/PAS.0000000000000428
34. Lim D, Ip PP, Cheung AN, Kiyokawa T, Oliva E (2015) Immunohistochemical Comparison of Ovarian and Uterine Endometrioid Carcinoma, Endometrioid Carcinoma With Clear Cell Change, and Clear Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 39: 1061–1069. doi:10.1097/PAS.0000000000000436
35. Fadare O, Zhao C, Khabele D, et al. (2015) Comparative analysis of Napsin A, alpha-methylacyl-coenzyme A racemase (AMACR, P504S), and hepatocyte nuclear factor 1 beta as diagnostic markers of ovarian clear cell carcinoma: an immunohistochemical study of 279 ovarian tumours. *Pathology* 47:105–111. doi:10.1097/PAT.0000000000000223